

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Ana Cristina Resende Camargos

**BIOMARCADORES NEUROENDÓCRINO-INFLAMATÓRIOS, ESTADO REDOX E
DESENVOLVIMENTO INFANTIL DE CRIANÇAS COM SOBREPESO E
OBESIDADE ENTRE SEIS E 24 MESES DE IDADE**

Diamantina-MG

2016

Ana Cristina Resende Camargos

**BIOMARCADORES NEUROENDÓCRINO-INFLAMATÓRIOS, ESTADO REDOX E
DESENVOLVIMENTO INFANTIL DE CRIANÇAS COM SOBREPESO E
OBESIDADE ENTRE SEIS E 24 MESES DE IDADE**

Tese apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Sociedade Brasileira de Fisiologia, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Rodrigues Lacerda

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Amaral Mendonça

Diamantina-MG

2016

Ficha Catalográfica-Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Viviane Pedrosa
CRB6-2641

C172 2016	<p>Camargos, Ana Cristina Resende</p> <p>Biomarcadores neuroendócrino-inflamatórios, estado redox e desenvolvimento infantil de crianças com sobrepeso e obesidade entre seis e 24 meses de idade. – Diamantina: UFVJM, 2016. 172p.</p> <p>Orientadora: Prof. Dra. Ana Cristina Rodrigues Lacerda Coorientador: Prof. Dra. Vanessa Amaral Mendonça</p> <p>Tese (Doutorado no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Obesidade 2. Sobrepeso 3. Biomarcadores 4. Adipocinas 5. Hormônios 6. Fator neurotrófico derivado do cérebro 7. Estado redox 8. Desenvolvimento infantil I. Título.</p> <p>CDD 615.82</p>
----------------------	---

Elaborada de acordo com dados fornecidos pelo autor

ANA CRISTINA RESENDE CAMARGOS

**BIOMARCADORES NEUROENDÓCRINO-INFLAMATÓRIOS, ESTADO REDOX E
DESENVOLVIMENTO INFANTIL DE CRIANÇAS COM SOBREPESO E
OBESIDADE ENTRE SEIS E 24 MESES DE IDADE**

Tese apresentada ao PROGRAMA MULTICÊNTRICO
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS, nível de DOUTORADO, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Rodrigues Lacerda

Data da aprovação: 26/08/2016



Prof.^ª Dr.^ª PAULA LUCIANA SCALZO - UFMG



Prof.^ª Dr.^ª MARIA DO CARMO GOUVEIA PELUZIO - UFV



Prof. Dr. KINULPE HONORATO SAMPAIO - UFVJM



Prof.^ª Dr.^ª ELIZABETH ADRIANA ESTEVES - UFVJM



Prof.^ª Dr.^ª ANA CRISTINA RODRIGUES LACERDA - UFVJM

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar em todos os momentos, por guiar meu caminho e fornecer forças para seguir em frente e finalizar essa gratificante etapa na minha vida.

Ao meu amado filho Gabriel, por ser minha melhor parte, pelo amor incondicional, por sempre me ensinar. Desculpe-me pela minha ausência em tantos momentos nessa trajetória. Esse trabalho é para você!

Ao meu marido Paulo Henrique pelo amor, companheirismo, cumplicidade e pela linda família que formamos. Obrigada por sempre me oferecer suporte para enfrentar todos os desafios. Esse trabalho não seria possível sem você.

Aos meus pais Geraldo e Socorro, bases da minha educação e formação. Obrigada por nunca medirem esforços para ajudar a realizar meus sonhos e por amarem com tanta intensidade o Gabriel. Amo muito vocês!

Ao meu irmão Daniel, pela ajuda e pela torcida, mesmo à distância.

À minha sogra Rosalice, ao meu sogro José Geraldo e cunhados, especialmente ao Carlos Eduardo, por toda ajuda e por cuidarem do Gabriel com tanto carinho.

À minha querida orientadora Ana Cristina Lacerda, que conduziu esse trabalho com tamanha leveza e sabedoria. O meu aprendizado ultrapassou as questões acadêmicas, pois seu lado humano é ímpar. Você é um modelo profissional a ser seguido, que possui um ‘brilho nos olhos’ ao ensinar e realizar pesquisa. Muito obrigada por ter aceitado me orientar.

À minha coorientadora Vanessa Amaral, pelo grande auxílio na condução desse trabalho. Obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos e por não poupar esforços para a realização da parte laboratorial.

Às minhas queridas alunas de iniciação científica e ‘quase filhas’ Camila e Katherine por toda a ajuda e cumplicidade na coleta de dados. Vocês foram essenciais na realização desse trabalho. À Giovana, que também nos auxiliou bastante durante alguns períodos.

Aos meus amigos e colegas do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFVJM. Ao Pedro, meu grande companheiro nessa jornada. À Rosalina,

Camila Neves e Sueli pelos ensinamentos e grande ajuda nas análises laboratoriais. À Vanessa Ribeiro pela cumplicidade para realização das análises. À Jeanne, Daniel e Michaela, pelo companheirismo e apoio nas disciplinas realizadas na UFMG. Aos demais colegas, pelo convívio e aprendizado.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pelos ensinamentos e auxílio durante essa jornada.

Ao Departamento de Fisioterapia da UFVJM, por permitirem meu afastamento para realização do Doutorado. Rosane e Hércules, muito obrigada por conduzirem com excelência o ensino da Pediatria. Sinto-me orgulhosa em fazer parte da equipe de vocês. Rosalina e Andreza, agradeço por engrandecerem nossa equipe na minha ausência.

Aos professores Etel, Cândido e Antônio por disponibilizarem os materiais e por contribuírem para a realização das análises laboratoriais. À Érica Vieira, pelo importante auxílio nas análises laboratoriais.

Aos professores Cunha e Alexandre pelo auxílio no entendimento das análises estatísticas.

Ao professor David Lee Nelson, pela contribuição nas correções dos artigos na língua inglesa.

Aos funcionários do Laboratório Emílio Avelar, pela realização dos exames de sangue.

A banca examinadora por aceitar o convite e engrandecer esse trabalho.

Aos meus grandes amigos, por tornar a vida mais feliz e mais leve. Tudo fica fácil quando temos pessoas especiais perto de nós!

Enfim, aos pais e crianças que aceitaram participar e contribuíram para a realização desse estudo. Foram várias lições de vida aprendidas com vocês.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

A obesidade infantil é considerada um dos maiores problemas de saúde pública do mundo. Estudos demonstram alteração do padrão de secreção de adipocinas, cortisol e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), bem como inflamação clínica crônica sublimiar e desequilíbrio redox em crianças com sobrepeso e obesidade na idade escolar. Além disso, o excesso de peso também está associado a reduzido desenvolvimento cognitivo e motor. Apesar da literatura indicar que os primeiros 24 meses de vida representam um período importante para o desenvolvimento da obesidade infantil, não existem evidências se crianças com sobrepeso e obesidade nesta faixa etária já apresentam alterações em parâmetros neuroendócrino-inflamatórios, com possível impacto no desenvolvimento infantil. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram: 1) analisar as concentrações plasmáticas de adipocinas e BDNF, as concentrações séricas de cortisol e o estado redox de crianças com sobrepeso/obesidade entre seis e 24 meses de idade; 2) avaliar o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças com sobrepeso/obesidade entre seis e 24 meses de idade e; 3) verificar associações entre os biomarcadores avaliados com o desenvolvimento cognitivo e motor nessa faixa etária. Foi realizado um estudo transversal com crianças com sobrepeso/obesidade e eutróficas entre seis e 24 meses de idade, cadastradas nas Estratégias de Saúde da Família. As concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina, resistina, receptores solúveis do fator de necrose tumoral 1 e 2 (sTNFR1 e sTNFR1), BDNF e as concentrações séricas de cortisol foram mensuradas pelo método ELISA. As quimiocinas foram mensuradas pela técnica *cytometric bead arrays* e o estado redox foi determinado por meio da detecção das concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) e da habilidade de redução do ferro (FRAP). O desenvolvimento infantil foi avaliado por meio do instrumento *Bayley Scales of Infant and Toddler Development*, 3ª edição (Bayley-III). Foi utilizado teste t para amostras independentes para comparar os grupos e correlação de *Pearson* ou *Spearman* para verificar a associação entre as variáveis. Além disso, foi utilizado um modelo de regressão linear múltipla *stepwise* para verificar a associação entre os biomarcadores selecionados com o desenvolvimento cognitivo e motor. As concentrações plasmáticas de leptina ($p=0,0001$), adiponectina ($p=0,0007$), BDNF ($p=0,003$) e as concentrações séricas de cortisol ($p=0,048$) foram significativamente superiores no grupo de crianças com sobrepeso/obesidade. Em contrapartida, as crianças deste grupo apresentaram menores concentrações de TBARS ($p=0,004$) e menor atividade das enzimas antioxidantes CAT ($p=0,045$) e SOD ($p=0,02$). Não

foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de quimiocinas, sTNFR1, sTNFR2, resistina e FRAP entre os grupos ($p > 0,05$). Além disso, as crianças do grupo sobrepeso/obesidade apresentaram menores escores de desenvolvimento cognitivo ($p = 0,03$) e motor ($p = 0,04$). Foi ainda encontrada associação significativa entre as concentrações plasmáticas de leptina e sTNFR1 com o escore composto cognitivo ($p = 0,001$) e das concentrações plasmáticas de sTNFR1 com o escore composto motor ($p = 0,003$). Todos esses resultados apontaram a presença de alterações neuroendócrino-inflamatórias em crianças com sobrepeso/obesidade entre seis e 24 meses de idade. Além disso, embora a maior parte das crianças com sobrepeso/obesidade apresentem desenvolvimento infantil dentro dos limites de normalidade, evidencia-se pior desempenho cognitivo e motor. Por fim, foi demonstrado que maiores concentrações de sTNFR1 e menores concentrações de leptina foram associadas com melhores desfechos de desenvolvimento infantil nessa faixa etária.

Palavras-chave: obesidade; sobrepeso; biomarcadores; adipocinas; hormônios; fator neurotrófico derivado do cérebro; estado redox; desenvolvimento infantil.

ABSTRACT

Childhood obesity is one of the world's most serious public health issues. Studies have demonstrated dysregulated secretion pattern of adipokines, cortisol, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), as well as chronic low-grade inflammation and redox imbalance in school-age overweight or obese children. Overweight/obese infants also had lower cognitive and motor development scores. Although the literature points out that the first 24 months of life represent an important period for the development of childhood obesity, it is not known whether overweight/obese infants in this age interval present alterations in neuroendocrine inflammatory parameters, with possible impact on child development. Then, the objectives of this study were: 1) to analyze the plasmatic levels of adipokines and BDNF, serum cortisol and redox status in overweight/obese infants between 6 and 24 months of age; 2) to evaluate the cognitive and motor development in overweight/obese infants between 6 and 24 months of age and; 3) to verify the association of the biomarkers evaluated with cognitive and motor development in this age interval. A cross-sectional study was conducted with infants with overweight/obesity and normal-weight between 6 and 24 months enrolled in Family Health Strategies. Plasma leptin, adiponectin, resistin, BDNF, soluble tumour necrosis factor receptors 1 and 2 (sTNFR1, sTNFR2), and serum cortisol levels were measured using conventional ELISA kits. Plasma chemokines were measured using the cytometric bead arrays kit, and oxidative stress was assessed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration, enzymes catalase (CAT) and dismutase superoxide (SOD) activity, as well by ferric reducing antioxidant power (FRAP). Infant development was performed using the Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 3rd edition (Bayley-III). A t test for independent samples was performed to compare the groups and Pearson and Spearman correlation was used to verify the association between parameters. Multiple linear stepwise regression models were utilized to verify the association between the biomarkers selected and cognitive and motor composite scores. Plasma levels of leptin ($p=0.0001$), adiponectin ($p=0.0007$), BDNF ($p=0.003$) and serum cortisol ($p=0.048$) were significantly higher in overweight/obese infants. In contrast, concentration of TBARS ($p=0.004$), CAT ($p=0.045$) and SOD activity ($p=0.02$) were lower in overweight/obese infants. There were no differences in the levels of chemokines, sTNFR1, sTNFR2, resistin and FRAP between groups ($p>0.05$). Moreover, overweight/obese infants had lower cognitive ($p=0.03$) and motor ($p=0.04$) development scores than normal-weight infants. A significant association of plasma leptin and sTNFR1 levels with cognitive composite scores ($p=0.001$) were found and plasma sTNFR1

levels were associated with motor composite scores ($p=0.003$). All these results point out neuroendocrine inflammatory response changes in overweight/obese infants between 6 and 24 months. Moreover, although most of overweight/obese infants have presented cognitive and motor development within normal limits, there is evidence of worse cognitive and motor performance. Finally, high sTNFR1 and low leptin levels were associated with increase developmental outcomes in infants in this age interval.

Keywords: obesity; overweight; biomarkers; adipokines; hormones; brain-derived neurotrophic factor; oxidative stress; infant development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Componentes celulares do tecido adiposo.....	20
Figura 2 – Alterações celulares no tecido adiposo no sobrepeso e obesidade.....	26
Figura 3 – Polarização de macrófagos e o processo de expansão do tecido adiposo.....	28
Figura 4 – Fatores que interferem positivamente e negativamente no processo de expansão do tecido adiposo.....	31
Figura 5 – Relação entre o processo inflamatório crônico e o desequilíbrio redox na obesidade.....	42
Figura 6 – Fluxograma das crianças participantes em cada grupo do estudo.....	59
Figura 7 – Concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina, resistina, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e cortisol sérico nos grupos eutrófico e sobrepeso/obeso.....	62
Figura 8 – Concentrações plasmáticas dos receptores solúveis do TNF (sTNFR1 e sTNFR2) e das quimiocinas (MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 e MIG) em crianças eutróficas e com sobrepeso/obesidade.....	63
Figura 9 – Estado redox em crianças eutróficas e com sobrepeso/obesidade.....	64
Figura 10 – Correlação entre parâmetros antropométricos (peso corporal, comprimento corporal e IMC) com os escores compostos cognitivo e motor.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da amostra.....	61
Tabela 2 – Associação entre os biomarcadores analisados no grupo sobrepeso/obeso.....	66
Tabela 3 – Associação entre os biomarcadores analisados no grupo eutrófico.....	67
Tabela 4 – Caracterização dos grupos eutrófico e sobrepeso/obeso.....	69
Tabela 5 – Comparação dos escores compostos cognitivo e motor entre os grupos eutrófico e sobrepeso/obeso.....	70
Tabela 6 – Análise de regressão linear simples com os escores compostos cognitivo e motor.....	72
Tabela 7 – Análise de regressão linear múltipla <i>stepwise</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Trifosfato de adenosina

Bayley-III – Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 3ª edição

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA – Albumina de soro bovino

CAT – Catalase

CBA – *Cytometric bead arrays*

CCR2 – Receptor de quimiocina C-C tipo 2

CCR5 – Receptor de quimiocina C-C tipo 5

CCEB-ABEP – Critério de Classificação Econômica Brasil, da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa

CDC – Centro de Prevenção e Controle de Doenças

DTPA - Ácido dietilenotriaminopentacético

ERONS – Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

EROS – Espécies reativas de oxigênio

ESF – Estratégias de Saúde da Família

Fe³⁺-TPTZ – Ferri-tripiridiltriazina

Fe²⁺- TPTZ – Ferroso-tripiridiltriazina

FRAP – Método de redução do ferro

GPx – Glutathione peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HHA – Hipotalâmico-hipofisário-adrenal

IFN γ – Interferon gama

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IMC – Índice de massa corporal

IP-10 – Proteína 10 induzida por interferon

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócito-1

MDA - Malondialdeído

MIG – Monocina induzida por interferon gama

MGRS – Estudo Multicêntrico de Referência em Crescimento

NCHS – Centro Nacional para Estatísticas da Saúde

O_2^- - Ânion superóxido

OH^\cdot - Radical hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – 0-phenylenediamine

RANTES – Quimiocina regulada na ativação, normalmente expressada e secretada por células T

SMP – Sociedade Mineira de Pediatria

SNC – Sistema nervoso central

SOD – Superóxido dismutase

sTNFR1 – Receptor solúvel 1 do fator de necrose tumoral

sTNFR2 – Receptor solúvel 2 do fator de necrose tumoral

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFR1 – Receptor 1 do fator de necrose tumoral

TNFR2 – Receptor 2 do fator de necrose tumoral

VLDL – Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Aspectos epidemiológicos do sobrepeso e obesidade infantil	16
1.2 Avaliação e monitoramento do sobrepeso e obesidade infantil	17
1.3 Biologia do tecido adiposo	20
1.4 Expansão do tecido adiposo branco	22
1.5 Expansão do tecido adiposo branco durante a infância	28
1.6 Fatores que interferem na expansão do tecido adiposo branco.....	29
1.6.1 Fatores que interferem positivamente na expansão do tecido adiposo	32
1.6.1.1 Adiponectina.....	32
1.6.1.2 Cortisol	33
1.6.1.3 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF).....	35
1.6.2 Fatores que interferem negativamente na expansão do tecido adiposo	36
1.6.2.1 Leptina	36
1.6.2.2 Resistina	38
1.6.2.3 Fator de necrose tumoral (TNF) e seus receptores solúveis	38
1.6.2.4 Quimiocinas.....	40
1.6.2.5 Desequilíbrio redox	41
1.6.3 Outros fatores que podem interferir na expansão do tecido adiposo	44
1.7 Associação entre os biomarcadores relacionados à obesidade e o desenvolvimento cognitivo e motor	44
1.7.1 Biomarcadores relacionados à obesidade e desenvolvimento infantil	44
1.7.2 Aspectos relacionados ao desenvolvimento cognitivo e motor em crianças com sobrepeso e obesidade	46
2 JUSTIFICATIVA	49
3 OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivo geral	50
3.2 Objetivos específicos	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos	51
4.2 População do estudo	51
4.2.1 Critérios de inclusão.....	51
4.2.2 Critérios de exclusão	51

4.3 Instrumentos de medidas	52
4.4 Procedimentos.....	53
4.4.1 Avaliação das concentrações plasmáticas das adipocinas e do BDNF	53
4.4.2 Avaliação das concentrações séricas de cortisol	55
4.4.3 Avaliação do estado redox	55
4.5 Análise estatística	57
4.5.1 Estudo 1.....	57
4.5.2 Estudo 2.....	58
4.5.3 Estudo 3.....	58
5 RESULTADOS	59
5.1 Estudo 1	60
5.1.1 Características dos participantes	60
5.1.2 Concentrações dos biomarcadores plasmáticos e séricos	62
5.1.3 Concentração de TBARS, atividade das enzimas CAT e SOD e capacidade antioxidante total.....	64
5.1.4 Correlação entre os biomarcadores analisados.....	65
5.2 Estudo 2	68
5.3 Estudo 3	71
6 DISCUSSÃO	74
6.1 Estudo 1	74
6.2 Estudo 2	79
6.3 Estudo 3	83
7 CONCLUSÕES	87
8 REFERÊNCIAS	88
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	107
ANEXO 2 - CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA BRASIL	111
ANEXO 3 - BAYLEY SCALES OF INFANT AND TODDLER DEVELOPMENT	112
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	113
APÊNDICE B – FICHA DE DADOS.....	115
APÊNDICE C – ARTIGO 1.....	117
APÊNDICE D – ARTIGO 2	140
APÊNDICE E – ARTIGO 3.....	156

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos do sobrepeso e obesidade infantil

Sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo excessivo de gordura corporal ou adiposidade que pode comprometer a saúde (WHO, 2016; GÜNGÖR, 2014). Ambos decorrem de um desequilíbrio calórico positivo que leva à expansão do tecido adiposo (ARNER *et al.*, 2010; MOLGAT *et al.*, 2012). O aumento do consumo de alimentos com alto valor energético associado à redução da atividade física são aspectos importantes no desencadeamento do excesso de peso (RONQUE *et al.*, 2005; SABIN *et al.*, 2015). Além dos fatores ambientais, fatores genéticos também estão envolvidos no aumento do peso corporal (VOGELS *et al.*, 2006; TOUNIAN, 2011).

Quando desenvolvidos na infância, o excesso de peso, que engloba o sobrepeso e a obesidade, é considerado um dos maiores problemas mundiais de saúde pública do século 21, uma vez que leva a alterações em longo prazo na saúde e bem-estar dos indivíduos (EUSER *et al.*, 2005; DANIELS *et al.*, 2009; GOING *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2011; SAHOO *et al.*, 2015). O excesso de peso na infância é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 (WHITE & STEPHENS, 2010; GOING *et al.*, 2011; JUONALA *et al.*, 2011; TILLING *et al.*, 2011). Pode também aumentar o risco para o desenvolvimento de outras doenças crônicas incapacitantes como acidente vascular encefálico, tumores malignos e desordens musculoesqueléticas (DANIELS *et al.*, 2009). Dessa forma, eleva os custos com a saúde e pode levar a incapacidade e morte prematura devido à ocorrência de doenças crônicas (GILLMAN, 2008; DANIELS *et al.*, 2009).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de crianças com sobrepeso e obesidade entre zero e cinco anos aumentou de 32 milhões em 1990 para 42 milhões em 2013. Assim, estima-se que o número de crianças com excesso de peso nessa faixa etária em todo o mundo aumentará para 70 milhões até 2025 (WHO, 2014). É importante apontar que a prevalência de sobrepeso e obesidade infantil pode variar em relação à faixa etária, sexo, raça ou nível socioeconômico (DE HOOG *et al.*, 2011; MUSHTAQ *et al.*, 2011; OGDEN *et al.*, 2012; 2014). Nas últimas décadas destaca-se a ocorrência do aumento do número de crianças obesas, mesmo em idades precoces (KIM *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2011). Em países desenvolvidos, 8,1% das crianças até os dois anos de idade são

consideradas obesas (OGDEN *et al.*, 2014). Entre as crianças menores de dois anos de idade, 6,5% apresentaram excesso de peso no Brasil de acordo com os dados da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher em 2006 (COCETTI *et al.*, 2012). O estudo de Silveira *et al.* (2014) destaca um aumento importante de sobrepeso e obesidade em pré-escolares no Brasil nos últimos anos. Em estudo recente, a prevalência de sobrepeso em crianças menores de cinco anos de idade em áreas urbanas no Brasil foi de 11,6% (Müller *et al.*, 2014).

O aumento da prevalência do excesso de peso infantil nos últimos anos tem ampliado a preocupação dos profissionais de saúde pública a respeito do seu impacto no futuro (DUBOIS & GIRARD, 2006; KIM *et al.*, 2006). Dessa forma, a OMS, desde 2004, vem desenvolvendo programas e estratégias para prevenir a obesidade infantil (WHO, 2004; WHO, 2012). No Brasil, já existem algumas ações para prevenção da obesidade infantil. O Programa Saúde na Escola, realizado pelo Governo Federal, por meio da parceria entre o Ministério da Saúde e o Ministério da Educação, possui dentre os seus objetivos, prevenir a obesidade infantil a partir da avaliação antropométrica e de orientações sobre hábitos saudáveis na idade escolar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). A Sociedade Mineira de Pediatria (SMP) também desenvolveu uma cartilha para a realização da Campanha de Prevenção à Obesidade Infantil (SMP, 2015). Existe ainda um projeto de lei (PL 6522/2009) tramitando na Câmara dos Deputados para criação do Programa de Prevenção, Orientação e Tratamento da Obesidade Infantil para escolas brasileiras (DADO, 2009). Porém, observa-se que essas ações são realizadas para crianças na idade escolar, o que demonstra pouca atenção para o desenvolvimento do sobrepeso e obesidade nos primeiros anos de vida.

1.2 Avaliação e monitoramento do sobrepeso e obesidade infantil

A avaliação do sobrepeso e da obesidade nos primeiros anos de vida pode ser realizada a partir de curvas de crescimento infantil de peso por idade, estatura por idade, peso/comprimento por idade e índice de massa corporal (IMC) por idade, servindo como guia para monitorar saúde, crescimento e desenvolvimento em crianças (ASHWORTH *et al.*, 2008; PIRES *et al.*, 2010). A partir da avaliação dos parâmetros das curvas de crescimento pode-se detectar se a criança está recebendo nutrição adequada e identificar situações que podem prejudicar o crescimento infantil, como desnutrição e obesidade. Cabe ressaltar que, tradicionalmente, as curvas de crescimento infantil eram utilizadas para identificar, principalmente, a desnutrição infantil. Porém, nas últimas décadas, a preocupação a respeito

do ganho de peso tem aumentado e as curvas de crescimento infantil têm sido utilizadas também para identificação precoce de sobrepeso e obesidade (GRUMMER-STRAWN *et al.*, 2010).

Historicamente, as curvas de crescimento do Centro Nacional para Estatísticas da Saúde (*National Center for Health Statistics – NCHS*), criadas em 1977, foram recomendadas pela OMS e utilizadas por muitos anos (HAMILL *et al.*, 1977), porém começaram a ser criticadas devido à ausência de heterogeneidade da amostra. No ano 2000, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention - CDC*) revisou os problemas apontados nas curvas NCHS e desenvolveu novas curvas de crescimento (KUCZMARSKI *et al.*, 2002). Posteriormente, as curvas de crescimento criadas pelo CDC apresentaram também algumas limitações, como por exemplo, só ter utilizado na amostra crianças dos Estados Unidos que eram alimentadas com fórmulas infantis (GRUMMER-STRAWN *et al.*, 2010).

Dessa forma, a OMS, entre 1997 e 2003, realizou o Estudo Multicêntrico de Referência em Crescimento (*Multicentre Growth Reference Study - MGRS*) para adequar as curvas de crescimento de crianças entre zero e cinco anos de idade. Essas curvas refletem padrões de crescimento de crianças que foram alimentadas também por amamentação exclusiva em seis países: Brasil, Gana, Índia, Noruega, Omã e Estados Unidos (ONIS, 2006b). Dentre as diferenças relacionadas às curvas de crescimento infantil, destaca-se que nas curvas da OMS foi incluída a curva de IMC por idade desde o nascimento e foram utilizadas na amostra crianças que foram alimentadas com leite materno e/ou com fórmulas infantis (ONIS, 2006a). Portanto, a partir do ano de 2006 as curvas da OMS foram recomendadas para identificação de sobrepeso e obesidade em crianças entre zero e dois anos de idade em todos os países (DE ONIS & LOBSTEIN, 2010; GRUMMER-STRAWN *et al.*, 2010).

Cabe destacar ainda que a identificação de sobrepeso e obesidade infantil dependerá da curva de crescimento, do indicador antropométrico e dos pontos de corte utilizados (DE ONIS & LOBSTEIN, 2010). Além disso, os pontos de corte utilizados pelas curvas de crescimento da OMS para definição de sobrepeso e obesidade são diferentes para crianças entre zero e cinco anos e para crianças e adolescentes entre cinco e 19 anos (CANADIAN PAEDIATRIC SOCIETY, 2010). Dentre os indicadores antropométricos utilizados para identificação de sobrepeso e obesidade nos dois primeiros anos de vida existem os índices de peso/comprimento por idade e o de IMC por idade.

O IMC, definido como o peso (Kg) dividido pela estatura ao quadrado (m^2) (CANADIAN PAEDIATRIC SOCIETY, 2010), tem emergido com o indicador antropométrico populacional prático, de baixo custo, não invasivo e universalmente aplicável para classificar sobrepeso e obesidade (DE ONIS & LOBSTEIN, 2010). Em crianças é necessário ainda considerar a idade para definir sobrepeso e obesidade infantil (WHO, 2016), uma vez o IMC aumenta do nascimento até cerca de nove meses de idade, período em que representa um pico de IMC e, a partir dessa idade, reduz para posteriormente se elevar novamente até alcançar um segundo pico por volta dos seis anos de idade (SILVERWOOD *et al.*, 2009). Apesar de estudos criticarem a utilização do IMC por idade para classificação de sobrepeso e obesidade na infância (GÜNGÖR, 2014; SAHOO *et al.*, 2015), autores tem demonstrado associação significativa entre os valores de IMC e a porcentagem de gordura corporal (DE CUNTO *et al.*, 2014; HOF *et al.*, 2013). Não existem critérios que definam sobrepeso e obesidade infantil de acordo com a porcentagem de gordura corporal (KREBS *et al.*, 2007). Dessa forma, o indicador IMC por idade é o mais utilizado para identificar sobrepeso e obesidade infantil na maior parte dos estudos na infância (EUSER *et al.*, 2005; IRIGOYEN *et al.*, 2008; LANDGRAF *et al.*, 2015). Para crianças entre zero e cinco anos de idade, a OMS considera como risco de sobrepeso crianças com IMC situado entre os percentis 85 e 97 (escore $z > +1$ e $< +2$); como sobrepeso crianças com IMC situado entre os percentis 97 e 99 (escore $z > +2$ e $< +3$) e; como obesidade criança com IMC acima do percentil 99 (escore $z > +3$) (ONIS, 2006b). Assim, crianças identificadas como sobrepeso e obesidade são ainda definidas como excesso de peso, ou seja, apresentam IMC por idade acima do percentil 97 (escore $z > +2$).

É importante ainda apontar que os primeiros 24 meses de vida representam um período importante para o desenvolvimento e prevenção da obesidade infantil (KIM *et al.*, 2006; BLAKE-LAMB *et al.*, 2016), uma vez que as maiores velocidades de aumento do peso e estatura ocorrem nesse período (SPYRIDES *et al.*, 2005). Bebês que apresentam maior IMC ou ganho acelerado de peso nos primeiros anos de vida possuem maior chance de serem obesos na infância, adolescência e vida adulta (SILVERWOOD *et al.*, 2009; BAIRD *et al.*, 2005; ONG & LOOS, 2006; VOGELS *et al.*, 2006; ERIKSSON *et al.*, 2008; ONG *et al.*, 2009; DRUET *et al.*, 2012). O ganho acelerado de peso nessa faixa etária está associado com maior padrão de distribuição de gordura abdominal e alta porcentagem de gordura corporal (EUSER *et al.*, 2005), que estão relacionados ao desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (FARMER, 2006; SETHI & VIDAL-PUIG, 2007; GOOSSENS, 2008; SUGANAMI & OGAWA, 2010; SORISKY *et al.*, 2013; GOOSSENS & BLAAK, 2015).

Duas revisões sistemáticas identificaram que, além do ganho acelerado de peso no início da infância, bebês com elevado peso ao nascimento, elevado IMC materno durante a gestação e gestantes tabagistas também são considerados fatores de risco associados com o excesso de peso na infância (WENG *et al.*, 2012; BAIDAL *et al.*, 2016).

Para compreender como a obesidade infantil pode impactar negativamente na saúde ao longo da vida dos indivíduos é importante conhecer a biologia do tecido adiposo, verificar como o tecido adiposo branco se expande na infância e quais as repercussões da sua expansão excessiva.

1.3 Biologia do tecido adiposo

O tecido adiposo é reconhecido como um órgão endócrino caracterizado por heterogeneidade celular (ARMANI *et al.*, 2010). Entre os componentes celulares existem adipócitos brancos e marrons, células tronco multipotentes, pré-adipócitos, fibroblastos, capilares/vasos sanguíneos e macrófagos (Figura 1) (ARMANI *et al.*, 2010; MOLGAT *et al.*, 2012; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2011). Cerca de um terço do tecido adiposo é constituído de adipócitos maduros presentes no parênquima celular e os dois terços restantes compreendem células da porção vascular estromal (ARMANI *et al.*, 2010).

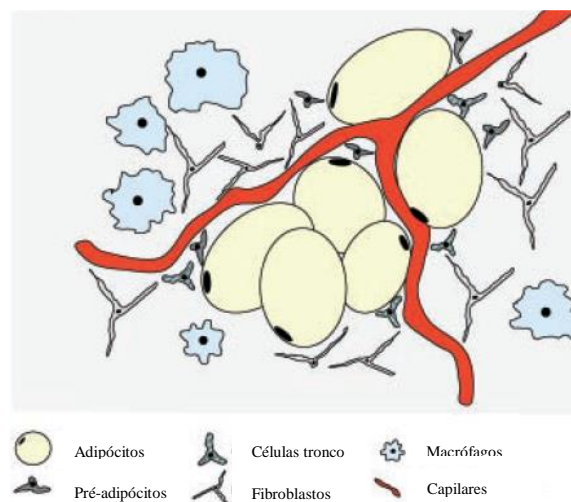


Figura 1. Componentes celulares do tecido adiposo. Adaptada de Armani *et al.* (2010).

As células encontradas em maior proporção no tecido adiposo são os adipócitos brancos. Estes apresentam uma única e grande gotícula unilocular, que corresponde ao maior

volume celular, mantendo o núcleo e citoplasma na periferia da célula (MAJKA *et al.*, 2011; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Em humanos, o tecido adiposo branco está disperso em depósitos intra-abdominais viscerais, bem como em depósitos subcutâneos nos quadris, coxas e abdome e possui como função primária armazenar e liberar energia (GESTA *et al.*, 2007; MAJKA *et al.*, 2011).

Em menor proporção existem os adipócitos marrons, que são células multiloculares, com alto conteúdo mitocondrial e função de oxidar ácidos graxos e produzir calor (MAJKA *et al.*, 2011; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Estão relacionados ao aumento do gasto energético e possuem importante função termogênica (GESTA *et al.*, 2007). Estes adipócitos estão normalmente presentes na região cervical, supra clavicular, paravertebral e interescapular e perirenal em recém-nascidos (GESTA *et al.*, 2007; TAM *et al.*, 2012), sendo sua função termogênica essencial para manter a temperatura de neonatos expostos ao frio (SETHI & VIDAL-PUIG, 2007).

As demais células estão localizadas na porção vascular estromal do tecido adiposo (SORISKY *et al.*, 2013). Dentre elas, células-tronco multipotentes e pré-adipócitos são precursoras de adipócitos, com potencial de replicar e diferenciar em adipócitos maduros exibindo características morfológicas, bioquímicas e enzimáticas das células de gordura (PETTERSSON *et al.*, 1985). Já as células endoteliais podem ser capazes de modular a função e a diferenciação dos adipócitos (ARMANI *et al.*, 2010). Além disso, existem dois tipos de macrófagos no tecido adiposo, que possuem um papel crítico na inflamação relacionada à obesidade (SUGANAMI & OGAWA, 2010; SORISKY *et al.*, 2013). Macrófagos do tipo M1 ou classicamente ativados, que possuem papel pró-inflamatório, e macrófagos do tipo M2 ou alternativamente ativados, com característica anti-inflamatória (MOLGAT *et al.*, 2012). A importância das células da porção vascular estromal será descrita com mais detalhes no tópico relacionado à expansão do tecido adiposo branco.

O tecido adiposo branco é considerado um órgão complexo com distribuição de múltiplos depósitos subcutâneos e viscerais em todo o corpo (ARMANI *et al.*, 2010; SORISKY *et al.*, 2013). A reserva de energia, uma eficiente maneira de armazenar calorias, é considerada uma das principais funções do tecido adiposo (HAUNER, 2004; SUGANAMI *et al.*, 2012). Quando ocorre aumento da ingestão alimentar e/ou diminuição do gasto energético, o excesso de energia é armazenado no tecido adiposo branco na forma de triglicerídeos (SETHI & VIDAL-PUIG, 2007), ação facilitada pela insulina (ITOH *et al.*, 2011). Já durante períodos de jejum ou durante a realização de exercício, o tecido adiposo

libera suprimento energético na forma de ácidos graxos (SORISKY *et al.*, 2013) devido ao aumento da secreção de catecolaminas ou outros hormônios lipolíticos (HAUNER, 2004).

A visão clássica e original do tecido adiposo como órgão responsável principalmente pelo armazenamento energético passivo tem sido alterada nos últimos anos. O tecido adiposo também é capaz de emitir sinais para regular a ingestão e o gasto energético, organizando o equilíbrio energético (SETHI & VIDAL-PUIG, 2007; MAJKA *et al.*, 2011). Adipócitos são capazes de produzir e liberar mais de 100 fatores como peptídeos, proteínas, hormônios e outros fatores não proteicos que possibilitam a interação entre células e órgãos (HAUNER, 2004). Assim, o tecido adiposo é considerado um órgão endócrino e metabólico multifuncional capaz de produzir e secretar vários fatores denominados adipocinas, que agem de forma autócrina, parácrina e endócrina (HAUNER, 2004; SETHI & VIDAL-PUIG, 2007; GOOSSENS, 2008). Por meio das adipocinas, o tecido adiposo mantém uma comunicação complexa com órgãos vizinhos e distantes influenciando uma variedade de processos fisiológicos e patofisiológicos (HAUNER, 2004; SUGANAMI & OGAWA, 2010). Esses fatores podem afetar múltiplas funções biológicas como ingestão alimentar, metabolismo energético, pressão arterial, homeostase da glicose, sensibilidade à insulina, imunidade e inflamação (SETHI & VIDAL-PUIG, 2007; MAJKA *et al.*, 2011; TORRES-LEAL *et al.*, 2012). Além de secretar adipocinas, adipócitos expressam receptores para vários hormônios, adipocinas e fatores de crescimento (TORRES-LEAL *et al.*, 2012) e apresentam controle neuro-hormonal (FÈVE, 2005; ARMANI *et al.*, 2010).

O tecido adiposo branco também possui a função de isolamento, suporte mecânico e proteção a traumas (HAUNER, 2004; SETHI & VIDAL-PUIG, 2007). Outra característica importante do tecido adiposo refere-se à sua capacidade de plasticidade ao longo da vida, uma vez que é capaz de expandir e contrair em resposta às alterações crônicas do equilíbrio energético (HAUNER, 2004; CAWTHORN *et al.*, 2012). Por fim, possui a capacidade de *turnover*, sendo que adipócitos maduros são substituídos por novos adipócitos a partir da diferenciação de pré-adipócitos (SORISKY *et al.*, 2013).

1.4 Expansão do tecido adiposo branco

O aumento da ingestão alimentar e/ou diminuição do gasto energético resulta em balanço energético positivo a fim de propiciar armazenamento de energia (LAUDES, 2011; SORISKY *et al.*, 2013). Dessa forma, o desequilíbrio energético positivo leva à expansão do tecido adiposo branco, que pode ocorrer pela geração de novos e pequenos adipócitos

(hiperplasia) e/ou pelo aumento do volume dos adipócitos pré-existentes (hipertrofia) (LACASA *et al.*, 2007; ARNER *et al.*, 2010; MOLGAT *et al.*, 2012).

De acordo com Laudes (2011), durante a expansão do tecido adiposo primeiramente o excesso de energia é armazenado na forma de triglicerídeos nos adipócitos pré-existentes, com alargamento dessas células, ou seja, ocorre hipertrofia dos adipócitos. Quando o número de adipócitos não é suficiente para armazenar mais triglicerídeos, novos adipócitos são gerados por um mecanismo conhecido como adipogênese, que se refere à hiperplasia dos adipócitos. A homeostase do tecido adiposo depende, portanto, do equilíbrio entre hiperplasia e hipertrofia do adipócito (MUIR *et al.*, 2016).

A expansão do tecido adiposo via hiperplasia não representa somente um processo passivo responsivo ao excesso de nutrientes, mas sim um programa altamente regulado e complexo que compreende eventos de sinalização intra e intercelular que ocorrem para a produção de adipócitos maduros (SETHI & VIDAL-PUIG, 2007). Para que este processo ocorra é necessária sequencia estruturada de genes regulatórios que compreendem o programa adipogênico (ROSEN & MACDOUGALD, 2006; SORISKY *et al.*, 2013).

A adipogênese é considerada um processo dinâmico e plástico que compreende múltiplos passos, com uma cascata de fatores de transcrição e proteínas que regulam a expressão de genes e levam ao desenvolvimento de adipócitos maduros (FÈVE, 2005; FARMER, 2006; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Compreende duas fases denominadas: (1) fase de determinação e (2) fase de diferenciação terminal. A primeira fase ou fase de determinação resulta da conversão de células-tronco multipotentes presentes no tecido adiposo para pré-adipócitos (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). As células-tronco multipotentes possuem a capacidade de se diferenciar em múltiplos tipos celulares como adipócitos, osteoblastos, condrócitos e miócitos (ARMANI *et al.*, 2010; MAJKA *et al.*, 2011; CAWTHORN *et al.*, 2012). Quando passam pela fase de determinação, não podem ser distinguidas morfológicamente das suas células precursoras, mas perdem o potencial de se diferenciar em outros tipos de células (ROSEN & MACDOUGALD, 2006). Adquirem, portanto, características de pré-adipócitos, que são células já comprometidas com a linhagem de adipócitos (ARMANI *et al.*, 2010; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Já na segunda fase ou fase de diferenciação terminal, os pré-adipócitos irão proliferar e adquirir as características funcionais dos adipócitos maduros (MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Para isto, os pré-adipócitos passam primeiramente por uma fase de crescimento exponencial seguida da organização das células para que ocorra o processo de diferenciação. Estas células então

alteram seu formato, permitindo reorganização da matriz extracelular e das proteínas do citoesqueleto. Por fim, entram no processo de maturação final, em que adquirem todas as características especializadas dos adipócitos tornando-se capazes de sintetizar ácidos graxos e armazenar triglicerídeos, bem como sintetizar e secretar fatores proteicos e não proteicos envolvidos na homeostase energética (FÈVE, 2005; ROSEN & MACDOUGALD, 2006).

Aproximadamente um décimo do total de adipócitos é renovado a cada ano pelo processo de adipogênese, mesmo em adultos (ARNER *et al.*, 2010). Um modelo corrente propõe que a expansão do tecido adiposo via hiperplasia origina pequenos adipócitos funcionais capazes de manter saudável a função do tecido adiposo (SORISKY *et al.*, 2013).

Em contrapartida, o processo de expansão via hipertrofia decorre do aumento do tamanho ou volume do adipócito (MUIR *et al.*, 2016). A hipertrofia do adipócito promove lipogênese, que ocorre como consequência da reesterificação de ácidos graxos livres juntamente com o glicerol ou por meio da síntese de triacilglicerol, o que promove armazenamento de triglicerídeos em adipócitos maduros (OTTO & LANE, 2005). Assim, o aumento da lipogênese e da captação de ácidos graxos favorece o acúmulo de lipídeos dentro de adipócitos (GATHERCOLE *et al.*, 2011).

Em indivíduos com peso adequado, o aumento do tamanho do adipócito é considerado benéfico para proteger outros tecidos de lipotoxicidade (MUIR *et al.*, 2016). De acordo com Hauner (2004), adipócitos de indivíduos com peso adequado possuem diâmetro médio de aproximadamente 70 μm , enquanto os de indivíduos obesos podem ter diâmetro médio de 120 μm . Porém, é importante destacar que quando a hipertrofia do adipócito ocorre além de 100 μm , pode ocorrer hipóxia e disfunção do tecido adiposo, com consequente desencadeamento do processo inflamatório (MUIR *et al.*, 2016). Vários estudos apontam que indivíduos com sobrepeso e obesidade apresentam adipócitos excessivamente hipertrofiados (SUGANAMI *et al.*, 2005; LUMENG *et al.*, 2007; ITOH *et al.*, 2011). As complicações consequentes à hipertrofia excessiva do tecido adiposo encontradas em indivíduos com sobrepeso e obesidade estão associadas à presença de um processo inflamatório crônico sublimiar (SUGANAMI & OGAWA, 2010; SORISKY *et al.*, 2013). Nesse processo ocorre remodelamento do tecido adiposo com alteração na proporção e no tipo de células presentes na sua porção vascular estromal. Ocorre infiltração de células imunes, excessiva produção de matriz extracelular, desregulação da produção de adipocinas e desequilíbrio redox, sendo que os macrófagos possuem papel central neste processo (SUGANAMI & OGAWA, 2010).

A presença de adipócitos excessivamente hipertrofiados promove a secreção de vários fatores quimiotáticos que induzem a infiltração de macrófagos para dentro do tecido adiposo.

O processo se inicia quando quimiocinas atraem os monócitos circulantes para migrarem e infiltrarem para dentro do tecido adiposo (SUGANAMI *et al.*, 2005; LUMENG *et al.*, 2007; ITOH *et al.*, 2011). Quando infiltrados, os monócitos se tornam macrófagos e secretam fatores que promovem interação parácrina com os adipócitos criando ciclo vicioso que agrava o processo inflamatório (SUGANAMI & OGAWA, 2010; ITOH *et al.*, 2011; SUGANAMI *et al.*, 2012). Assim, macrófagos do tecido adiposo e adipócitos hipertrofiados produzem um painel de adipocinas pró-inflamatórias e metabólitos que participam da ativação endotelial, por meio da produção de moléculas de adesão, permitindo o processo de adesão/rolamento e, por fim, a transmigração de monócitos por meio do endotélio pelo processo de diapedese (KAMEI & CARMAN, 2010; DALMAS *et al.*, 2011).

Uma vez infiltrados e presentes no tecido adiposo, macrófagos podem ser polarizados para exercer tanto efeitos pró-inflamatórios, conhecidos como macrófagos do tipo M1, ou efeitos anti-inflamatórios, denominados macrófagos do tipo M2. A determinação do tipo de macrófago presente no tecido adiposo depende do estímulo do microambiente local do tecido e da população de monócitos precursores circulantes (DALMAS *et al.*, 2011). Macrófagos do tipo M1 são associados à inflamação e destruição tecidual, sendo responsáveis pela secreção de adipocinas pró-inflamatórias e pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Já macrófagos do tipo M2 estão relacionados com reparo, angiogênese e secretam mediadores anti-inflamatórios (LUMENG *et al.*, 2007; OHASHI *et al.*, 2010; ITOH *et al.*, 2011).

Em indivíduos com peso adequado, os macrófagos do tecido adiposo correspondem a cerca de 10% das células da porção vascular estromal e encontram-se no estado de ativação anti-inflamatório M2, que ajudam a manter a homeostase do tecido adiposo (DALMAS *et al.*, 2011; MOLGAT *et al.*, 2012). Entretanto, no sobrepeso e obesidade, devido à infiltração e diferenciação de monócitos circulantes, os macrófagos do tecido adiposo representam cerca de 50% de células da porção vascular estromal, sendo que a maior parte corresponde ao estado de ativação pró-inflamatório M1 (MOLGAT *et al.*, 2012). Além disso, ocorre infiltração de outras células imunes como linfócitos, neutrófilos e mastócitos, agravando o processo inflamatório (GOOSSENS, 2008; SUGANAMI & OGAWA, 2010; DALMAS *et al.*, 2011). Portanto, são observadas mudanças no balanço entre macrófagos M1/M2, com aumento na proporção de macrófagos do tipo M1 (DALMAS *et al.*, 2011). Na obesidade crônica destaca-se a presença de excessivo número de macrófagos do tipo M1, que promove sua organização em formato de coroa (“*crown-like structures*”) no tecido adiposo, com consequente hipóxia e morte do adipócito (Figura 2) (GOOSSENS, 2008; DALMAS *et al.*, 2011; LANDGRAF *et al.*, 2015).

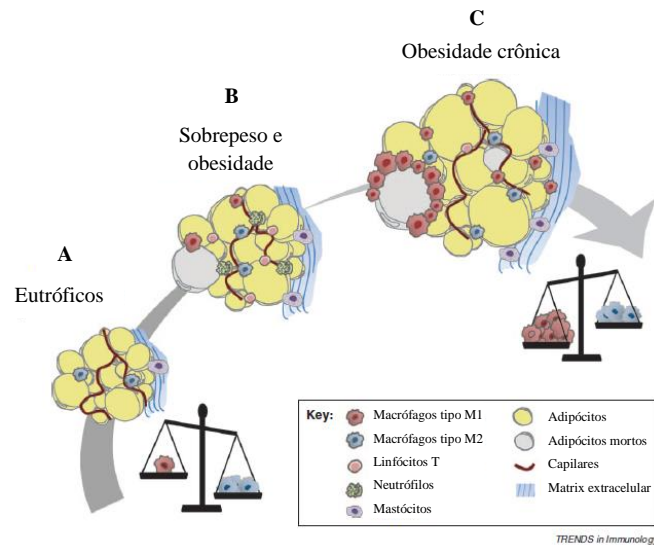


Figura 2. Alterações celulares no tecido adiposo no sobrepeso e obesidade. A: Indivíduos eutróficos apresentam maior proporção de macrófagos do tipo M2. B: Com o início do sobrepeso e/ou obesidade ocorre a infiltração de células imunes que promovem alteração no balanço entre macrófagos M1/M2. C: Na obesidade crônica ocorre aumento acentuado na proporção de macrófagos do tipo M1 e sua organização em formato de coroa. Adaptado de Dalmas *et al.* (2011).

Dessa forma, a hipertrofia excessiva e a infiltração de macrófagos do tipo M1 para o tecido adiposo desencadeiam desregulação do padrão de secreção das adipocinas transferindo-o para um perfil pró-inflamatório (GOOSSENS, 2008; DALMAS *et al.*, 2011). Assim, ocorre aumento da secreção de adipocinas pró-inflamatórias e redução da expressão de adipocinas anti-inflamatórias (SUGANAMI *et al.*, 2005). Todas estas alterações secundárias ao processo inflamatório crônico sublimar podem então interferir no processo fisiológico de expansão do tecido adiposo, tornando-o disfuncional. De acordo com Sorisky *et al.* (2013), o predomínio de macrófagos pro-inflamatórios do tipo M1 reduz a sobrevivência, proliferação e capacidade adipogênica do pré-adipócito. Além disso, a secreção de fatores pró-inflamatórios reduz a capacidade de diferenciação de pré-adipócitos e inibe a formação de novos adipócitos (LACASA *et al.*, 2007), comprometendo ou impedindo o processo de adipogênese. De acordo com Arner *et al.* (2010) indivíduos com hipertrofia excessiva dos adipócitos produzem cerca de 70% a menos de adipócitos por ano, sendo que quanto maior o grau de hipertrofia do adipócito, menor a taxa de formação de novos adipócitos.

Com a menor taxa de formação de adipócitos o armazenamento energético torna-se comprometido e precisará ocorrer principalmente por meio do maior acúmulo de lipídeos no adipócito, com consequente hipóxia local (GOOSSENS, 2008; ARNER *et al.*, 2010;

SORISKY *et al.*, 2013). A matriz extracelular também se encontra alterada em indivíduos obesos, apresentando-se rígida e com excesso de fibrose pericelular, o que restringe a capacidade de armazenamento de mais lipídeos no tecido adiposo (SUGANAMI *et al.*, 2012; TAM *et al.*, 2012; SORISKY *et al.*, 2013). Quando a expansibilidade do tecido adiposo torna-se um fator limitante para armazenar lipídeos de forma segura no adipócitos, estes se deslocam para outros órgãos como músculos, fígado e pâncreas promovendo alterações metabólicas (SETHI & VIDAL-PUIG, 2007; GOOSSENS, 2008; GOOSSENS & BLAAK, 2015). Nesse contexto, o tecido adiposo encontra-se disfuncional, induzindo resistência à insulina localmente no tecido por vias autócrinas e/ou parácrinas (GOOSSENS, 2008; SORISKY *et al.*, 2013; GOOSSENS & BLAAK, 2015). Além disso, esses outros órgãos, que não são designados para armazenar grandes quantidades de lipídeos, são mais susceptíveis a efeitos tóxicos do excesso de acumulação de lipídeos, o que contribui para o desenvolvimento de doenças crônicas cardiovasculares e metabólicas (SETHI & VIDAL-PUIG, 2007; GOOSSENS, 2008; SUGANAMI & OGAWA, 2010; SORISKY *et al.*, 2013; GOOSSENS & BLAAK, 2015).

Em contraposição, quando os macrófagos anti-inflamatórios do tipo M2 predominam, pré-adipócitos funcionais são capazes de se diferenciar em novos adipócitos, o que permite adequada hiperplasia do tecido, com manutenção da função metabólica e sensibilidade à insulina (SORISKY *et al.*, 2013). Macrófagos do tipo M2 possuem a função de fagocitose de *debris* de adipócitos mortos e remoção de ácidos graxos com o objetivo de prevenir a lipotoxicidade (DALMAS *et al.*, 2011). Além disso, macrófagos do tipo M2 são capazes de promover reparo e angiogênese no tecido adiposo (LUMENG *et al.*, 2007; OHASHI *et al.*, 2010), mecanismo essencial para que a adipogênese ocorra (NISHIMURA *et al.*, 2007). O predomínio de macrófagos do tipo M2 ainda mantém a flexibilidade da matriz extracelular, cujo colágeno é o principal constituinte, sendo também essencial no processo de adipogênese e expansão fisiológica do tecido adiposo (TAM *et al.*, 2012). Dessa forma, o estado de ativação dos macrófagos pode alterar o equilíbrio entre hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos por meio do controle da sobrevivência e do número de pré-adipócitos (MOLGAT *et al.*, 2012). O predomínio de macrófagos do tipo M2 mantém a capacidade de realizar adipogênese e o crescimento hiperplásico, com preservação da função metabólica (SORISKY *et al.*, 2013). Sun *et al.* (2011) definem como expansão saudável do tecido adiposo aquela em que a adipogênese ocorre com vascularização, mínima inflamação e manutenção da sensibilidade à insulina. Em contraste, o crescimento hipertrófico excessivo é associado com a expansão patológica, inflamação crônica do tecido adiposo e desenvolvimento de resistência à

insulina (SUN *et al.*, 2011; MOLGAT *et al.*, 2012). A figura 3 sintetiza como o processo de expansão do tecido adiposo pode ser modificado de acordo com a polarização de macrófagos no tecido adiposo.

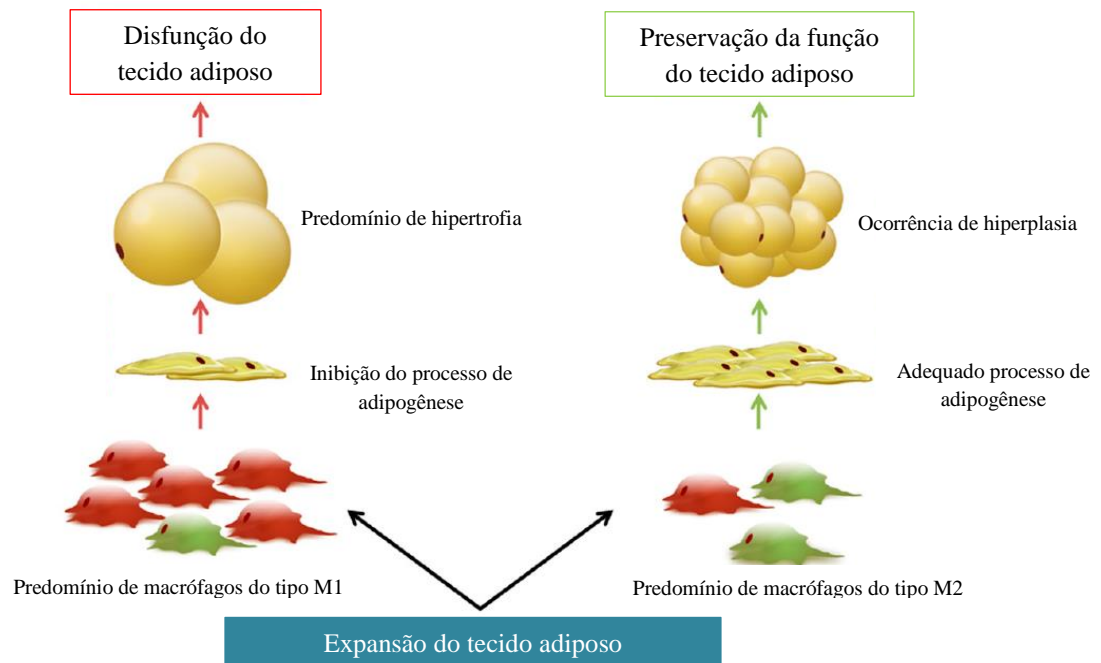


Figura 3. Polarização de macrófagos e o processo de expansão do tecido adiposo. Adaptado de Sorisky *et al.* (2013).

1.5 Expansão do tecido adiposo branco durante a infância

A expansão do tecido adiposo branco é um processo fisiológico que ocorre durante o desenvolvimento do tecido adiposo na infância. Tanto o número quanto o tamanho dos adipócitos aumentam com o crescimento e desenvolvimento infantil, mesmo em crianças sem excesso de peso (LANDGRAF *et al.*, 2015). Um estudo clássico realizado por Häger *et al.* (1977) com crianças eutróficas entre um e 18 meses de idade demonstrou que nos primeiros 12 meses de vida a expansão do tecido adiposo parece ocorrer principalmente devido ao aumento no tamanho do adipócito. Já entre 12 e 18 meses de idade a expansão do tecido adiposo destas crianças ocorreu principalmente devido ao aumento no número de adipócitos. Posteriormente, Knittle *et al.* (1979) também encontraram resultados semelhantes em crianças eutróficas, sendo que a expansão do tecido adiposo ocorreu primariamente pelo aumento do tamanho do adipócito entre seis e 12 meses de idade, com menor contribuição do número de adipócitos. Entre 12 e 24 meses de idade foi observada redução do tamanho do adipócito

associada ao aumento do número de adipócitos. Observa-se, portanto, que crianças eutróficas antes dos dois anos de idade apresentam marcada hiperplasia e a partir desta idade até por volta dos 10 anos de idade parece haver relativa estabilidade no tamanho do adipócito (KNITTLE *et al.*, 1979).

Já em relação às crianças com excesso de peso, foram identificados estudos sobre a expansão do tecido adiposo somente a partir de dois anos de idade. No estudo de Knittle *et al.* (1979) evidenciou-se aumento significativo tanto no número quanto no tamanho dos adipócitos em crianças obesas, quando comparadas aos seus pares eutróficos entre dois e 19 anos de idade. Foi ainda apontado que crianças obesas aos dois anos de idade já apresentavam o mesmo tamanho de adipócitos de indivíduos adultos eutróficos (KNITTLE *et al.*, 1979). Em um estudo recente, crianças obesas também apresentaram aumento significativo do número e tamanho dos adipócitos quando comparadas às crianças eutróficas a partir de seis anos de idade (LANDGRAF *et al.*, 2015).

Estes achados em conjunto indicam que as crianças obesas já apresentam precocemente importante hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, o que promove disfunção do tecido adiposo (SBARBATI *et al.*, 2006; LANDGRAF *et al.*, 2015). Estudos ainda demonstram infiltração de células sanguíneas como macrófagos, granulócitos e linfócitos no tecido adiposo de crianças obesas na idade escolar, indicando que o processo inflamatório crônico subclínico inicia-se precocemente (SBARBATI *et al.*, 2006). Observa-se ainda hipertrofia excessiva e infiltração e rearranjo dos macrófagos em formato de coroa em crianças obesas entre seis e oito anos de idade (LANDGRAF *et al.*, 2015). Porém, não foram encontrados estudos que avaliassem estes aspectos nos primeiros anos de vida, permanecendo uma lacuna na literatura no que tange o entendimento da expansão do tecido adiposo em crianças com sobrepeso e obesidade, especialmente na faixa etária de seis a 24 meses de idade.

1.6 Fatores que interferem na expansão do tecido adiposo branco

É importante verificar que a expansão do tecido adiposo pode ser influenciada de forma positiva ou negativa por vários fatores tais como adipocinas, EROS, hormônios circulantes, fatores de crescimento, nutrientes e moléculas de sinalização celular (FÈVE, 2005; SIVIERO-MIACHON *et al.*, 2009; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). O equilíbrio entre estes fatores pode promover ou bloquear a cascata de fatores

de transcrição que coordenam o processo de diferenciação (FÈVE, 2005; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012). Dessa forma, sinais pró-adipogênicos e anti-adipogênicos determinam se ocorrerá ou não a indução de genes que coordenam o processo de adipogênese e diferenciação do pré-adipócito para adipócito maduro (XU *et al.*, 1999; FÈVE, 2005; SIVIERO-MIACHON *et al.*, 2009; GATHERCOLE *et al.*, 2011).

As adipocinas, além das ações endócrinas, podem agir localmente exercendo efeitos autócrinos ou parácrinos, que podem interferir estimulando ou inibindo a expansão do tecido adiposo (FU *et al.*, 2005; SETHI & VIDAL-PUIG, 2007; HARRIS, 2014). O termo adipocinas refere-se aos peptídeos e proteínas bioativos produzidos e secretados pelo tecido adiposo (GUERRE-MILLO, 2004; ANTUNA-PUENTE *et al.*, 2008). Os adipócitos são os principais secretores de adipocinas, porém os macrófagos presentes no tecido adiposo também são capazes de secretar adipocinas (FANTUZZI, 2005).

As principais adipocinas secretadas pelos adipócitos são a leptina, que age no controle da homeostase energética (APRATH-HUSMANN *et al.*, 2001; ALIKAŞLIFOĞLU *et al.*, 2009) e a adiponectina, que possui ação anti-inflamatória (FANTUZZI, 2005; OHASHI *et al.*, 2010). Porém, com o desenvolvimento da obesidade ocorre desregulação do padrão de secreção de adipocinas, com aumento da concentração de adipocinas com característica pró-inflamatórias produzidas por adipócitos hipertrofiados, macrófagos do tipo M1 e células imunes presentes no tecido adiposo (FANTUZZI, 2005; SUGANAMI *et al.*, 2005; LACASA *et al.*, 2007; ANTUNA-PUENTE *et al.*, 2008; SUGANAMI & OGAWA, 2010; FAIENZA *et al.*, 2012; SUGANAMI *et al.*, 2012; TORRES-LEAL *et al.*, 2012). Assim, observa-se aumento das concentrações de leptina, resistina, fator de necrose tumoral (*tumour necrosis factor* - TNF), interleucina 6 (IL-6), interferon gama (IFN γ) e proteínas reativas de fase aguda, bem como das quimiocinas: proteína quimiotática de monócito -1 (*monocyte chemoattractant protein-1* - MCP-1), quimiocina regulada na ativação, normalmente expressada e secretada por células T (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted* - RANTES), interleucina 8 (IL-8), proteína 10 induzida por interferon (*interferon-inducible protein 10* - IP-10) e monocina induzida por interferon gama (*monokine induced by interferon- γ* - MIG) (ECONOMOU *et al.*, 2004; FANTUZZI, 2005; SUGANAMI *et al.*, 2005; SBARBATI *et al.*, 2006; ANTUNA-PUENTE *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2008; YOSHINAGA *et al.*, 2008; JERMENDY *et al.*, 2010; LEBENSZTEJN *et al.*, 2010; LEONI *et al.*, 2010; DALMAS *et al.*, 2011; ROTH *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011; BRESLIN *et al.*, 2012; SCHIPPER *et al.*, 2012; TORRES-LEAL *et al.*, 2012; ROTH *et al.*, 2013; CODOÑER-FRANCH *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2014b; CARMONA-MONTESINOS *et*

al., 2015; LANDGRAF *et al.*, 2015), que podem interferir negativamente no processo de adipogênese, inibindo-o (FÈVE, 2005). O aumento da produção de EROS e o desequilíbrio redox também podem impedir a diferenciação do pré-adipócito (XIAO *et al.*, 2010; MURDOLO *et al.*, 2013). Dessa forma, o aumento das concentrações destes fatores, considerados negativos, contribui para a perpetuação da hipertrofia excessiva característica da obesidade.

Em contrapartida, o aumento das concentrações de adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória, é capaz de promover e acelerar a adipogênese (FU *et al.*, 2005). Elevadas concentrações de glicocorticoides e do fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor* – BDNF) também podem facilitar a ocorrência da adipogênese, promovendo a diferenciação do pré-adipócito para adipócito (SIVIERO-MIACHON *et al.*, 2009; NIEMELÄ *et al.*, 2008; ARMANI *et al.*, 2010). Portanto, o aumento das concentrações destes fatores, considerados positivos, permite que a expansão do tecido adiposo ocorra por meio do equilíbrio entre hiperplasia e hipertrofia do adipócito. A figura 4 sintetiza os fatores que podem interferir positivamente e negativamente no processo de expansão do tecido adiposo e que serão estudados com maiores detalhes nos próximos tópicos.

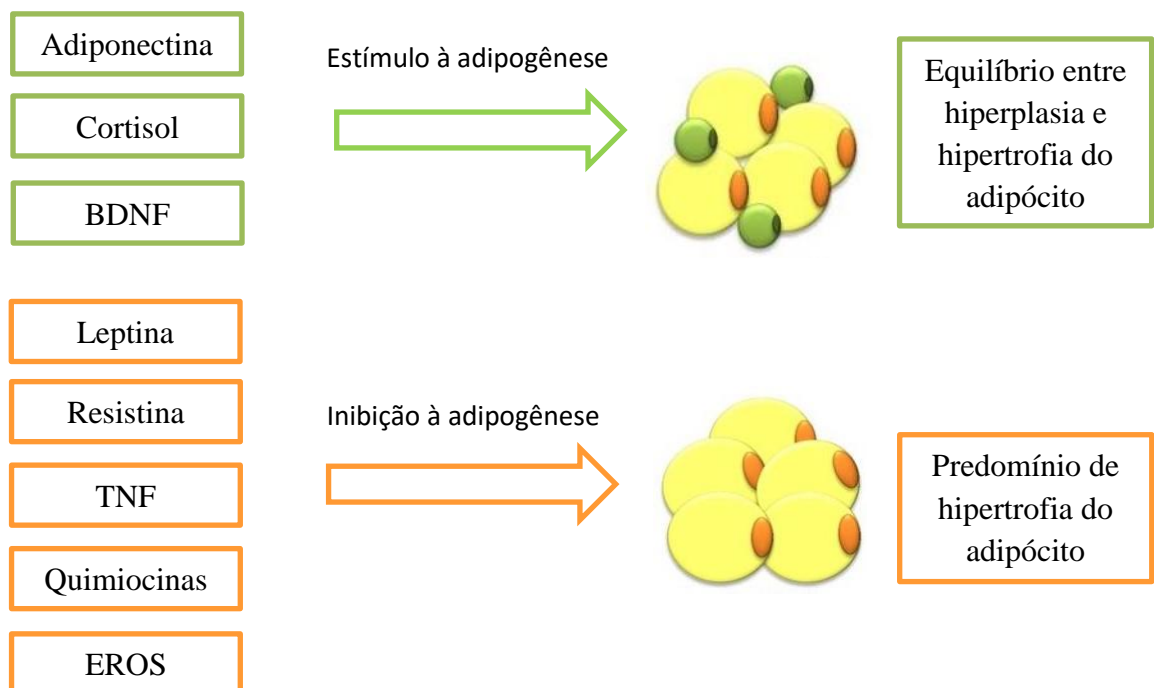


Figura 4. Fatores que interferem positivamente e negativamente no processo de expansão do tecido adiposo.

1.6.1 Fatores que interferem positivamente na expansão do tecido adiposo

1.6.1.1 Adiponectina

A adiponectina é um peptídeo de 30-kDa produzido exclusivamente por adipócitos maduros, que apresenta maior síntese no tecido adiposo subcutâneo quando comparado ao tecido adiposo visceral (KÖRNER *et al.*, 2007; MARTOS-MORENO *et al.*, 2013). As concentrações de adiponectina são inversamente relacionadas à adiposidade, apresentando-se reduzidas na obesidade (GUERRE-MILLO, 2004; ALIKAŞLIFOĞLU *et al.*, 2009). A adiponectina possui um papel protetor importante, devido às suas funções anti-inflamatória, anti-aterogênica e anti-diabética, que protege os indivíduos de doenças cardiovasculares e metabólicas (OKAMOTO *et al.*, 2006; ZOU *et al.*, 2007; OKAMOTO *et al.*, 2008).

Esta adipocina age como um regulador direto do fenótipo de macrófagos, favorecendo sua mudança para tipo anti-inflamatório M2, o que explica o seu efeito protetor em doenças metabólicas e cardiovasculares (OHASHI *et al.*, 2010). Assim, induz a secreção de citocinas anti-inflamatórias e inibe a atividade biológica de citocinas pró-inflamatórias como o TNF (BRUUN *et al.*, 2003; FANTUZZI, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2006). Altas concentrações de adiponectina suprimem também as quimiocinas e o recrutamento de linfócitos T, controlando o desenvolvimento de doenças arteriais como a aterosclerose (OKAMOTO *et al.*, 2008). Regula ainda, negativamente, a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, impedindo a aterogênese (FANTUZZI, 2005). Por fim, possui a capacidade de aumentar o transporte de glicose responsivo à insulina, aumentando a sensibilidade à insulina em todo o corpo (FU *et al.*, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2008).

Cabe ressaltar que as concentrações de adiponectina dependem do estágio maturacional e das características celulares do tecido adiposo (MARTOS-MORENO *et al.*, 2010). As concentrações de adiponectina fetal e neonatal são elevadas quando comparadas a adultos e correlacionam-se positivamente com a adiposidade em recém-nascidos (STEFAN *et al.*, 2002; KOTANI *et al.*, 2004; JEFFERY *et al.*, 2008). Porém, suas concentrações reduzem progressivamente com a idade e com o aumento da adiposidade durante a infância (JEFFERY *et al.*, 2008), sendo negativamente correlacionadas com a adiposidade a partir de dois anos de idade (STEFAN *et al.*, 2002; JEFFERY *et al.*, 2008; MARTOS-MORENO *et al.*, 2013). Dessa forma, a obesidade na idade escolar está relacionada à hipoadiponectinemia (STEFAN *et al.*, 2002; ZOU *et al.*, 2007), que representa um preditor precoce para o desenvolvimento de síndrome metabólica em crianças (KÖRNER *et al.*, 2007). A deficiência de adiponectina

predispõe à hipertrofia excessiva do adipócito, com infiltração de macrófagos com fenótipo pró-inflamatório do tipo M1, o que aumenta a resistência à insulina em músculos esqueléticos e fígado e acelera o desenvolvimento da aterosclerose (FU *et al.*, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2008; OHASHI *et al.*, 2010; LANDGRAF *et al.*, 2015).

Diante do exposto acima, a relação entre adiposidade e concentração de adiponectina pode mudar de positiva para negativa durante a infância, o que pode ser explicado pelas alterações da distribuição do tamanho dos adipócitos nesse período (KOTANI *et al.*, 2004). De acordo com Fu *et al.* (2005) e Meyer *et al.* (2013), quanto maior o tamanho do adipócitos menor a concentração de adiponectina. Em contrapartida, quanto menor o tamanho dos adipócitos e maior o número de adipócitos, maior será a síntese de adiponectina (KOTANI *et al.*, 2004; FU *et al.*, 2005). Como a adiponectina não é expressa no pré-adipócito, sua concentração aumenta com a diferenciação do adipócito (KÖRNER *et al.*, 2005). Dessa forma, no início da infância observa-se que crianças obesas apresentam maior número de adipócitos, diferente de adultos obesos que apresentam hipertrofia excessiva (MARTOS-MORENO *et al.*, 2010), o que pode interferir na síntese e secreção de adiponectina e consequente expansão do tecido adiposo. A adiponectina ainda participa do metabolismo do tecido adiposo de forma autócrina e/ou parácrina auxiliando na manutenção do tamanho do adipócito. Além disso, o incremento na expressão de adiponectina é capaz de aumentar a diferenciação de pré-adipócitos para adipócitos, acelerando a adipogênese (FU *et al.*, 2005). Adipogênese, então, produz novos adipócitos que produzem mais adiponectina (TORRES-LEAL *et al.*, 2012).

1.6.1.2 Cortisol

O cortisol é considerado o principal e mais potente glicocorticóide produzido em humanos, secretado pela glândula adrenal por meio da ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA) em resposta a um estressor físico ou fisiológico (VELDHORST *et al.*, 2013; PAREDES & RIBEIRO, 2014). Em condições basais, a secreção de cortisol apresenta um ritmo circadiano, com pico no início da manhã, entre 20 a 30 minutos após acordar, declínio gradual durante o dia e diminuição das concentrações no meio da noite (POWER *et al.*, 2006; LUMENG *et al.*, 2007; MICHELS *et al.*, 2011; KEIL, 2012). O cortisol é considerado um hormônio contra regulatório, sendo que sua secreção aumenta durante os períodos de jejum e estresse (FRIED *et al.*, 2000). Dessa forma, é importante para mobilizar o combustível armazenado em “respostas de luta e fuga”, bem como pelo

reabastecimento dos estoques de combustíveis quando as concentrações de insulina estão elevadas com a alimentação (LEE *et al.*, 2014).

O cortisol é essencial para o balanço energético, uma vez que promove efeitos no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Em concentrações fisiológicas, o cortisol aumenta a gliconeogênese hepática, o armazenamento de glicose no fígado e a taxa de lipólise no tecido adiposo, bem como reduz a captação de glicose no tecido adiposo e muscular (GOODMAN, 2010; PAREDES & RIBEIRO, 2014). Além disso, glicocorticóides em geral possuem ação anti-inflamatória e regulam a produção de adipocinas, suprimindo genes em vias imune/inflamatórias e apoptóticas (PATSOURIS *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2014). Assim, reduzem a secreção de quimiocinas e inibem a secreção de adipocinas pró-inflamatórias e o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo (PATSOURIS *et al.*, 2009). O cortisol possui ação semelhante à adiponectina, induzindo a polarização de macrófagos para o tipo M2, o que reduz as respostas inflamatórias, remodelamento e reparo tecidual (DALMAS *et al.*, 2011). Glicocorticóides também podem interferir no desenvolvimento, metabolismo e função endócrina do tecido adiposo (LEE *et al.*, 2014), uma vez que o cortisol é um potente indutor da adipogênese, que estimula os fatores de transcrição e promove a diferenciação de pré-adipócitos (FÈVE, 2005; NIEMELÄ *et al.*, 2008; SIVIERO-MIACHON *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2014).

Apesar dos benefícios do cortisol em concentrações fisiológicas, a exposição crônica ao cortisol em altas concentrações pode promover vários efeitos metabólicos e celulares que comprometem a homeostase energética. O excesso de cortisol pode levar à degradação proteica muscular e induzir a acumulação de tecido adiposo visceral, favorecendo à resistência à insulina e desenvolvimento da síndrome metabólica (GATHERCOLE *et al.*, 2011; GUZZETTI *et al.*, 2014; PAREDES & RIBEIRO, 2014). Em humanos, o excesso de cortisol é associado com obesidade central e repercussões metabólicas (FRIED *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2014). Dentre os mecanismos para explicar a obesidade central, alguns autores apontam que o excesso de cortisol produzido localmente pode agir de forma parácrina promovendo adipogênese no tecido adiposo visceral, o que contribui para o acúmulo central de gordura (FÈVE, 2005; LEE *et al.*, 2014). De acordo com Paredes e Ribeiro (2014), como a secreção de cortisol induz lipólise, ocorre liberação da lipoproteína de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein* - VLDL), aumentando a liberação de ácidos graxos livres na circulação, que são armazenados principalmente no tecido adiposo visceral. Além disso, o cortisol também está envolvido nos processos de diferenciação, proliferação e redistribuição

de adipócitos da periferia para os depósitos centrais de gordura (FÈVE, 2005; GUZZETTI *et al.*, 2014).

Dessa forma, o excesso crônico de cortisol produz aumento da gordura corporal visceral e abdominal (FÈVE, 2005; SIVIERO-MIACHON *et al.*, 2009; ADAM *et al.*, 2010), que está associada a fatores de risco cardiovasculares e alterações metabólicas em crianças, adolescentes e adultos obesos (ADAM *et al.*, 2010; BARKIN *et al.*, 2012; PRODAM *et al.*, 2013; VELDHORST *et al.*, 2013). Em longo prazo, o aumento das concentrações de cortisol também está associado à elevação de biomarcadores pró-inflamatórios e ao aumento do risco cardiovascular em adolescentes obesas (RUSSELL *et al.*, 2009).

Por fim, é importante destacar que o cortisol também pode ser considerado um marcador potencial para problemas de aspectos comportamentais e psicológicos do desenvolvimento infantil (FRANCIS *et al.*, 2013). Crianças com menores níveis socioeconômicos e que vivem em lares com situações emocionais de estresse apresentam alterações no padrão de secreção do cortisol (BLAIR *et al.*, 2005; LUMENG *et al.*, 2007).

1.6.1.3 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O BDNF é um membro da família das neurotrofinas que possui um importante papel no sistema nervoso central (LIU *et al.*, 2014). É altamente expresso no sistema nervoso central, principalmente nas estruturas corticais e hipocampais, sendo expresso também em tecidos periféricos como o tecido adiposo, fígado e músculos (CHAO *et al.*, 2006; ROTH *et al.*, 2013; JIN *et al.*, 2015).

Esta neurotrofina é essencial para o desenvolvimento, diferenciação, crescimento e manutenção do sistema nervoso, plasticidade sináptica, aprendizado e memória, e está relacionada com sobrevivência e função neuronal (CHAO *et al.*, 2006; ROSAS-VARGAS *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2014; MAROSI & MATTSON, 2014). Está relacionada também com processos cognitivos e comportamentais (ROSAS-VARGAS *et al.*, 2011; MAROSI & MATTSON, 2014).

Como é expresso também no tecido adiposo, o BDNF é considerado um regulador do processo de diferenciação do pré-adipócito induzindo a adipogênese (BERNHARD *et al.*, 2013). Atua juntamente a outros fatores de crescimento, mediando os sinais de diferenciação (NIEMELÄ *et al.*, 2008). Além disso, possui um importante papel na homeostase energética, regulação do apetite e controle do peso corporal. O BDNF participa da via da leptina atuando

como um fator anorexigênico por meio do complexo vagal dorsal no sistema nervoso central (ROSAS-VARGAS *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014).

Em concentrações fisiológicas, o BDNF possui papel neuroprotetor (CALABRESE *et al.*, 2014; JIN *et al.*, 2015), pois estimula o transporte de glicose e a biogênese mitocondrial, aumentando a resistência neuronal ao estresse oxidativo e metabólico (MAROSI & MATTSON, 2014). Dessa forma, pode proteger contra danos neuronais (HUANG *et al.*, 2014a). Porém, estudos apontam que crianças obesas apresentam menores concentrações de BDNF quando comparadas a crianças eutróficas (ARAKI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). A redução da expressão do BDNF está associada à hiperfagia e redução da saciedade (ROSAS-VARGAS *et al.*, 2011), ao comprometimento cognitivo (CHAO *et al.*, 2006) e ao comprometimento do metabolismo de glicose (LI *et al.*, 2015). Evidências demonstram que redução da expressão do BDNF em indivíduos obesos pode ocorrer como consequência à resistência da leptina (ROTH *et al.*, 2013), ao processo inflamatório crônico sublimiar (CALABRESE *et al.*, 2014) ou à exposição do hipocampo às concentrações elevadas de glicocorticóides (WOSISKI-KUHN *et al.*, 2014).

É importante considerar que outros fatores, além da obesidade, podem interferir na expressão do BDNF. Fatores ambientais como, por exemplo, os cuidados maternos, podem promover modificações epigenéticas e aumentar a expressão de BDNF (ROSAS-VARGAS *et al.*, 2011). O número de plaquetas presentes na amostra coletada também pode interferir nas concentrações de BDNF, e dessa forma, a medida das concentrações no soro e plasma podem apresentar resultados contraditórios (EL-GHARBAWY *et al.*, 2006). Por fim, as concentrações de BDNF são positivamente correlacionadas ao peso ao nascimento, o que pode influenciar os achados de crianças em diferentes faixas etárias (ARAKI *et al.*, 2014).

1.6.2 Fatores que interferem negativamente na expansão do tecido adiposo

1.6.2.1 Leptina

A leptina é um polipeptídeo de 16-kDa produzido e secretado, principalmente, por adipócitos maduros (KIM *et al.*, 2001; MARTOS-MORENO *et al.*, 2013). A leptina secretada pelo tecido adiposo atravessa a barreira hematoencefálica para agir nos receptores dos centros de apetite localizados no hipotálamo, sinalizando a respeito dos estoques de lipídeos no tecido adiposo (APRATH-HUSMANN *et al.*, 2001; FU *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2013; CRUJEIRAS *et al.*, 2015).

Sua principal ação é manter a homeostase energética por meio da redução da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (APRATH-HUSMANN *et al.*, 2001; ALIKAŞLIFOĞLU *et al.*, 2009; LEONI *et al.*, 2010). A leptina possui um papel importante na regulação da ingestão alimentar, por meio da modulação de sinais orexigênicos e anorexigênicos (ROSAS-VARGAS *et al.*, 2011). A leptina, portanto, provê informação sobre a quantidade de energia reservada para o sistema regular a alimentação, bem como a utilização do substrato e oxidação do combustível, aumentando o gasto energético nos músculos (FRIED *et al.*, 2000; SETHI & VIDAL-PUIG, 2007).

O tecido adiposo de indivíduos obesos possui a capacidade de secretar, em média, sete vezes mais leptina quando comparado ao de indivíduos eutróficos, sendo que tanto o aumento do número quanto o aumento de tamanho dos adipócitos são responsáveis pelo aumento da secreção de leptina (FRIED *et al.*, 2000). Dessa forma, o aumento da concentração de leptina está diretamente associado à quantidade de massa do tecido adiposo ou grau de obesidade (ANTUNA-PUENTE *et al.*, 2008; LEONI *et al.*, 2010; CRUJEIRAS *et al.*, 2015). A leptina, então, pode atuar tanto direta quanto indiretamente para modificar a massa adiposa por meio da redução do tamanho e/ou número adipócitos, prevenindo o acúmulo de lipídeos em adipócitos (HARRIS, 2014).

Porém, elevadas concentrações endógenas de leptina podem induzir à resistência à leptina (SAVINO *et al.*, 2009; LEONI *et al.*, 2010), o que reduz seus efeitos benéficos na regulação do equilíbrio energético (GUERRE-MILLO, 2004; CRUJEIRAS *et al.*, 2015). A redução da resposta à leptina pode alterar a regulação da ingestão energética, a absorção de nutrientes, o metabolismo e a sensibilidade à insulina (CRUJEIRAS *et al.*, 2015). A hiperleptinemia pode aumentar a infiltração de macrófagos e a produção de adipocinas pró-inflamatórias, alterando sua função para desencadear o processo inflamatório crônico e desequilíbrio redox (FANTUZZI, 2005; CRUJEIRAS *et al.*, 2015), podendo contribuir negativamente no processo de adipogênese. Estudos mostram que altas concentrações de leptina são fortemente associadas com a obesidade abdominal em crianças (ZHANG *et al.*, 2011) e podem ser preditivas de fatores de risco cardiovasculares e síndrome metabólica em crianças entre seis e 12 anos de idade (GOOSSENS, 2008; YOSHINAGA *et al.*, 2008).

É importante ainda considerar que vários fatores secretados durante o crescimento e o desenvolvimento podem modular a síntese de leptina, modificando sua dinâmica de secreção durante a infância (MARTOS-MORENO *et al.*, 2013). Glicocorticoides, insulina e estrógenos podem estimular a síntese de leptina e andrógenos podem inibir sua síntese (FRIED *et al.*, 2000; MARTOS-MORENO *et al.*, 2013).

1.6.2.2 Resistina

A resistina é um peptídeo secretado e expresso principalmente por monócitos e macrófagos, sendo uma adipocina expressa também por adipócitos hipertrofiados (TORRES-LEAL *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013). É uma proteína específica do tecido adiposo que está aumentada em indivíduos obesos (ROTH *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013). Apresenta associação com adiposidade visceral e é considerada uma importante preditora de doenças cardiovasculares (CODONER-FRANCH *et al.*, 2014) e do desenvolvimento da resistência à insulina (ZOU *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2014b). O aumento da concentração de resistina está relacionado também com o desenvolvimento de síndrome metabólica e aterosclerose em crianças obesas (CHEN *et al.*, 2013).

Em relação ao processo de expansão do tecido adiposo, a resistina, assim como outras adipocinas pró-inflamatórias, pode inibir a adipogênese (FÈVE, 2005) e contribuir para o processo de disfunção do tecido adiposo (SORISKY *et al.*, 2013).

1.6.2.3 Fator de necrose tumoral (TNF) e seus receptores solúveis

O TNF é produzido pela porção vascular estromal do tecido adiposo, sendo apontado com uma adipocina secretada principalmente por macrófagos do tipo M1 presentes no tecido adiposo (XU *et al.*, 1999; SUGANAMI *et al.*, 2005; LACASA *et al.*, 2007). É, portanto, considerado o principal mediador parácrino do processo inflamatório no tecido adiposo (SUGANAMI *et al.*, 2005; LACASA *et al.*, 2007). O TNF é uma citocina multifuncional que pode regular vários processos celulares e biológicos como função imune, diferenciação celular, proliferação, apoptose e metabolismo energético (CAWTHORN & SETHI, 2008).

O TNF exerce seus efeitos biológicos no tecido adiposo via dois receptores distintos presentes na superfície celular de adipócitos: receptor 1 do fator de necrose tumoral (*tumour necrosis factor receptor 1* - TNFR1) e receptor 2 do fator de necrose tumoral (*tumour necrosis factor receptor 2* – TNFR2). Ambos os receptores são biologicamente ativos nos adipócitos e sinalizam para uma variedade de funções (XU *et al.*, 1999; XU & HOTAMISLIGIL, 2001). Assim, o TNF, por meio de seus receptores, possui a capacidade de alterar a homeostase da glicose e o metabolismo lipídico, desempenhando importante papel no desenvolvimento da resistência à insulina (SETHI & HOTAMISLIGIL, 1999; CAWTHORN & SETHI, 2008). Vários estudos apontam elevação das concentrações dos receptores do TNF

em crianças e adultos obesos, que estão associadas com a resistência à insulina (BULLÓ *et al.*, 2002; DZIENIS-STRACZKOWSKA *et al.*, 2003; JERMENDY *et al.*, 2010; ADAMSKA *et al.*, 2012).

As concentrações de TNF podem também agir indiretamente para alterar a homeostase energética, por meio da regulação da função e da expansibilidade do tecido adiposo (SETHI & HOTAMISLIGIL, 1999; CAWTHORN & SETHI, 2008). Elevadas concentrações de TNF podem suprimir a expressão de genes adipogênicos e inibir a diferenciação de pré-adipócitos (SETHI & HOTAMISLIGIL, 1999; XU *et al.*, 1999; XU & HOTAMISLIGIL, 2001). Aumentam a expressão de quimiocinas em adipócitos, que também inibem a diferenciação de adipócitos (GERHARDT *et al.*, 2001). Além disso, inibem a expressão e secreção de adiponectina (BRUUN *et al.*, 2003; ALIKAŞLIFOĞLU *et al.*, 2009), que possui como função estimular a adipogênese (FU *et al.*, 2005). Dessa forma, o aumento da concentração do TNF pode comprometer a capacidade de armazenar lipídeos no tecido adiposo pela supressão do recrutamento e diferenciação de pré-adipócitos (CAWTHORN & SETHI, 2008). Apresentam ainda vários efeitos nos adipócitos que incluem inibição da captação de ácidos graxos livres, estimulação da lipólise, promoção de apoptose e desencadeamento de desequilíbrio redox (XU & HOTAMISLIGIL, 2001; HAUNER, 2004; CAWTHORN & SETHI, 2008).

É importante considerar que os dois receptores de TNF podem apresentar vias de sinalização diferentes e possuir funções distintas (CAWTHORN & SETHI, 2008). Vários autores indicam que o TNF modula a função do tecido adiposo predominantemente por meio do TNFR1 (SETHI & HOTAMISLIGIL, 1999; SETHI *et al.*, 2000; MACEWAN, 2002; CAWTHORN & SETHI, 2008). O TNFR1 está envolvido na inibição da diferenciação do adipócito (SETHI & HOTAMISLIGIL, 1999; XU & HOTAMISLIGIL, 2001), da sinalização do receptor de insulina e da captação de glicose estimulada pela insulina (SETHI *et al.*, 2000). Porém, estudos mais recentes têm demonstrado que o TNFR2 também está relacionado com a intolerância à glicose e com a resistência à insulina em crianças e adultos obesos (DZIENIS-STRACZKOWSKA *et al.*, 2003; JERMENDY *et al.*, 2010; SCHIPPER *et al.*, 2012).

Cabe destacar que ambos os receptores podem ser proteoliticamente clivados para liberar na superfície celular suas formas solúveis, denominadas sTNFR1 e sTNFR2 (SETHI & HOTAMISLIGIL, 1999; CAWTHORN & SETHI, 2008). Assim, quanto maiores as concentrações de TNF, mais receptores solúveis são clivados como um mecanismo de controle. Os receptores solúveis representam proteínas muito estáveis, que prolongam os efeitos biológicos do TNF, tornando-se facilmente detectáveis no plasma (BEMELMANS *et al.*, 1996; FERNANDEZ-REAL *et al.*, 1998). Dessa forma, os receptores solúveis podem ser

considerados biomarcadores mais acessíveis e confiáveis, uma vez que refletem com maior precisão o grau de ativação do sistema do TNF que suas próprias concentrações circulantes (BEMELMANS *et al.*, 1996; BULLÓ *et al.*, 2002; DZIENIS-STRACZKOWSKA *et al.*, 2003; CAWTHORN & SETHI, 2008). De acordo com Rocha *et al.* (2014), baixas concentrações de sTNFR1 e sTNFR2 são capazes de estabilizar a atividade do TNF e elevadas concentrações desses receptores podem antagonizar os efeitos biológicos do TNF.

1.6.2.4 Quimiocinas

As quimiocinas representam uma família de peptídeos de baixo peso molecular que induzem a quimiotaxia de leucócitos, ou seja, possuem o papel de ativar e atrair leucócitos para locais de dano tecidual e/ou áreas de inflamação (BAGGIOLINI, 1998; HEDRICK *et al.*, 1999; XU *et al.*, 2015). Podem ser consideradas adipocinas, uma vez que, assim como o TNF, são produzidas também por adipócitos hipertrofiados e macrófagos do tecido adiposo (XU *et al.*, 1999; LACASA *et al.*, 2007; PATSOURIS *et al.*, 2009; SUGANAMI *et al.*, 2012).

Conforme já explicitado, adipócitos hipertrofiados secretam quimiocinas que atraem células sanguíneas circulantes para infiltrar no tecido adiposo, contribuindo para a produção de adipocinas pró-inflamatórias e desequilíbrio redox (HAUNER, 2004; ITOH *et al.*, 2011; SUGANAMI *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2015). Quimiocinas estimulam a expressão de TNF e são reguladas positivamente pelo TNF em adipócitos maduros. Dessa forma, esses biomarcadores produzem padrões de expressão e efeitos similares durante a adipogênese (GERHARDT *et al.*, 2001).

Quimiocinas exercem seus efeitos biológicos por meio da ativação dos seus receptores correspondentes, que pertencem à superfamília dos receptores acoplados à proteína G e são expressos tanto em pré-adipócitos quanto em adipócitos maduros (GERHARDT *et al.*, 2001). Dentre suas funções, as quimiocinas contribuem para polarização de macrófagos para o estado pró-inflamatório (M1), recrutamento de outras células imunes para o tecido adiposo, inibição da diferenciação do adipócito e desenvolvimento da resistência à insulina e do processo de aterogênese em indivíduos obesos (GERHARDT *et al.*, 2001; STRACZKOWSKI *et al.*, 2002; ECONOMOU *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006; LACASA *et al.*, 2007; LUMENG *et al.*, 2007; GOOSSENS, 2008; ROCHA *et al.*, 2008; SINDHU *et al.*, 2015).

A família de quimiocinas consiste de vários membros, que são divididos de acordo com a sequência de aminoácidos (PATSOURIS *et al.*, 2009), sendo que algumas delas estão relacionadas com o desenvolvimento da obesidade infantil. Alguns estudos já encontraram

aumento das concentrações das quimiocinas MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 e MIG em crianças com excesso de peso na idade escolar (ECONOMOU *et al.*, 2004; BRESLIN *et al.*, 2012; SCHIPPER *et al.*, 2012; SAMAAN *et al.*, 2013).

A interação da quimiocina MCP-1 com seu receptor de quimiocina C-C tipo 2 (C-C chemokine receptor type 2 - CCR2) é considerada pivô para o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo e o desenvolvimento da resistência à insulina induzida pela obesidade (GOOSSENS, 2008; SUGANAMI & OGAWA, 2010; ROTH *et al.*, 2011; BRESLIN *et al.*, 2012; SINDHU *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015). A via MCP-1/CCR2 contribui para a polarização de macrófagos em seu estado pró-inflamatório M1 em indivíduos obesos (LUMENG *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2015).

Juntamente com MCP-1, a quimiocina RANTES interage com seu receptor do tipo 5 (CCR5) contribuindo para o recrutamento de macrófagos do tipo M1 e produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como para o recrutamento de linfócitos (ECONOMOU *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2015). Dessa forma, a via RANTES/CCR5, independente ou cooperativamente com a via MCP-1/CCR2 possui um papel central na indução e manutenção da inflamação induzida pela obesidade e no desenvolvimento da resistência à insulina (XU *et al.*, 2015).

Apesar das quimiocinas MCP-1 e RANTES serem as mais discutidas na literatura em relação às complicações da obesidade, outras quimiocinas como a IL-8, também são expressas por adipócitos e reguladas positivamente pelo TNF (GERHARDT *et al.*, 2001). As concentrações de IL-8 estão relacionadas com o desenvolvimento de aterogênese e diabetes em indivíduos com obesidade visceral (STRACZKOWSKI *et al.*, 2002). Além disso, também estão envolvidas no recrutamento de outras células imunes para o tecido adiposo (LACASA *et al.*, 2007).

Por fim, IP-10 e MIG também estão relacionadas com a infiltração de monócitos e outras células imunes para o tecido adiposo (VIELMA *et al.*, 2013; SINDHU *et al.*, 2015). Essas quimiocinas são estimuladas pela citocina pró-inflamatória IFN- γ e funcionam como quimioatratores de linfócitos T na obesidade, desencadeando aterogênese e interferindo na biologia do tecido adiposo (ROCHA *et al.*, 2008).

1.6.2.5 Desequilíbrio redox

O metabolismo redox corresponde a uma rede de interação complexa que envolve a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONS) e os sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (GALINIER *et al.*, 2006). Dessa forma, o

aumento da geração de ERONS e a redução da capacidade dos mecanismos de defesa antioxidante em neutralizá-los promove desequilíbrio redox (OLIVER *et al.*, 2010; CANAS *et al.*, 2013; MARSEGLIA *et al.*, 2014; WAROLIN *et al.*, 2014). Observa-se que o desequilíbrio redox relacionado à obesidade está associado a vários mecanismos que podem promover a formação de radicais livres (FERNÁNDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2011; VINCENT & TAYLOR, 2006; PHAM-HUY *et al.*, 2008; CANAS *et al.*, 2013).

A maior parte dos estudos demonstra que o processo inflamatório crônico subliniar e a secreção de adipocinas pró-inflamatórias estão diretamente associados ao desequilíbrio redox (Figura 5) (OLIVER *et al.*, 2010; MARSEGLIA *et al.*, 2014; FERNÁNDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2011). Assim, na obesidade ocorre aumento da produção de adipocinas pró-inflamatórias juntamente com o aumento da produção de EROS (FERNÁNDEZ-SANCHEZ *et al.*, 2011; PHAM-HUY *et al.*, 2008; CANAS *et al.*, 2013; SAVINI *et al.*, 2013; MARSEGLIA *et al.*, 2014). Dentre as EROS, evidencia-se aumento da produção do ânion superóxido (O_2^-) e do radical hidroxila (OH^-) (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004), que são moléculas instáveis e possuem elétrons disponíveis para promover dano oxidativo de lipídios, proteínas e/ou DNA (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004; SFAR *et al.*, 2013). Quando em excesso, esses radicais podem danificar as membranas celulares por um processo chamado de peroxidação lipídica. Essa reação leva a formação do malondialdeído (MDA), evidenciado pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como outros compostos dieno conjugados que são citotóxicos e mutagênicos (PHAM-HUY *et al.*, 2008).

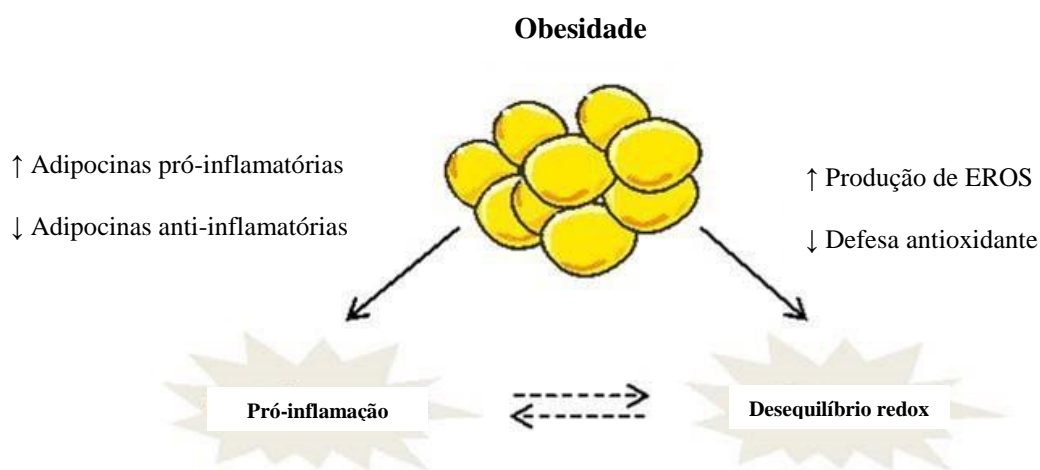


Figura 5. Relação entre o processo inflamatório crônico e o desequilíbrio redox na obesidade. Adaptado de Pillon & Soulage. (2012).

Esse processo está principalmente relacionado à idade e ao envelhecimento, sendo que o excesso de radicais livres pode acometer todas as moléculas do organismo e levar ao comprometimento da estrutura e função celular ou resultar em morte celular (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004; SFAR *et al.*, 2013). Dessa forma, pode também desencadear várias doenças crônicas degenerativas em longo prazo como as doenças cardiovasculares, síndrome metabólica e diabetes *mellitus* tipo 2 (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004; FURUKAWA *et al.*, 2004; PHAM-HUY *et al.*, 2008; OLIVER *et al.*, 2010; FAIENZA *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2012; CANAS *et al.*, 2013; RUPÉREZ *et al.*, 2013; MARSEGLIA *et al.*, 2014).

Apesar de ter relação com a idade, a literatura vem apontando recentemente que crianças com excesso de peso na idade escolar ou na adolescência já apresentam desequilíbrio entre a atividade oxidante e antioxidante (ZHU *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 2009; FAIENZA *et al.*, 2012; SFAR *et al.*, 2013; WAROLIN *et al.*, 2014). Estudos indicam que crianças obesas apresentam maior peroxidação lipídica sistêmica, evidenciada pelo aumento da concentração de TBARS (FURUKAWA *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2006).

Além disso, observa-se que crianças obesas apresentam menor defesa antioxidante (FURUKAWA *et al.*, 2004; PHAM-HUY *et al.*, 2008; OLIVER *et al.*, 2010; RUPÉREZ *et al.*, 2013; MATUSIK *et al.*, 2015). Evidências demonstram alteração da atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), importantes para combater as EROS geradas durante o metabolismo oxidativo (SFAR *et al.*, 2013; ALBUALI, 2014). A SOD representa a primeira linha de defesa contra radicais livres, que catalisa a reação do ânion superóxido (O_2^-) para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Posteriormente, o oxidante formado (H_2O_2) é transformado em água (H_2O) e oxigênio (O_2) pela CAT ou glutathione peroxidase (GPx) (VINCENT & TAYLOR, 2006; RUPÉREZ *et al.*, 2013; SFAR *et al.*, 2013).

Observa-se ainda que o sistema de defesa antioxidante é também representado por antioxidantes exógenos (RUPÉREZ *et al.*, 2013). Dentre eles, pode-se citar a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), beta-caroteno, selênio, manganês e zinco, que podem ser obtidos por dieta ou suplementação (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004; PHAM-HUY *et al.*, 2008; SAVINI *et al.*, 2013). É importante destacar que quando os antioxidantes combatem os radicais livres, esses se tornam oxidados, devendo, dessa forma, ser constantemente restaurados no corpo. Assim, os antioxidantes fornecidos pela dieta possuem um papel importante ajudando os antioxidantes endógenos a neutralizar o desequilíbrio redox (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004; PHAM-HUY *et al.*, 2008). Dessa forma, a capacidade

antioxidante total é representada por todos os antioxidantes, que também se encontra reduzida na obesidade na infância, aumentando a chance de danos oxidativos (MOLNAR *et al.*, 2004; VINCENT & TAYLOR, 2006; RENTERÍA *et al.*, 2015).

Por fim, cabe destacar que a presença de desequilíbrio redox compromete a diferenciação do pré-adipócito, o que reduz a capacidade adipogênica do tecido e compromete a homeostase metabólica (XIAO *et al.*, 2010; MURDOLO *et al.*, 2013).

1.6.3 Outros fatores que podem interferir na expansão do tecido adiposo

A literatura aponta que vários outros fatores, além dos destacados acima, podem interferir na expansão do tecido adiposo, mas não serão abordados nesse trabalho. Dentre eles, cabe apontar que o aumento da secreção de outras citocinas pró-inflamatórias também pode inibir a adipogênese, reduzindo o número de adipócitos e perpetuando o processo inflamatório crônico sublimar e a disfunção do tecido adiposo (FÈVE, 2005). Além disso, hormônios andrógenos e estrógenos podem inibir a adipogênese e interferir no processo de expansão do tecido adiposo (ARMANI *et al.*, 2010). Em contrapartida, hormônios tireoidianos, mineralocorticoides, insulina, fatores de crescimento semelhante à insulina e fatores de crescimento de fibroblastos podem induzir a adipogênese e promover a diferenciação do pré-adipócito (ARMANI *et al.*, 2010; MORENO-NAVARRETE & FERNÁNDEZ-REAL, 2012).

1.7 Associação entre os biomarcadores relacionados à obesidade e o desenvolvimento cognitivo e motor

1.7.1 Biomarcadores relacionados à obesidade e desenvolvimento infantil

Conforme já exposto, o tecido adiposo produz substâncias denominadas como adipocinas que são capazes de se comunicar com vários órgãos e tecidos corporais, incluindo o cérebro, para regular o metabolismo (MILLER *et al.*, 2013). Algumas adipocinas, como a leptina, possuem ação central no hipotálamo e hipocampo que podem influenciar o crescimento, maturação e desenvolvimento cerebral (STIEG *et al.*, 2015; FARR *et al.*, 2015). Além disso, o aumento da concentração de adipocinas sistêmicas com papel pró-inflamatório, característicos da obesidade crônica, pode ainda promover neuroinflamação no sistema nervoso em desenvolvimento e levar ao comprometimento da sobrevivência e proliferação de

novos neurônios (MILLER *et al.*, 2013; GARCÍA-BUENO *et al.*, 2008; CALABRESE *et al.*, 2014). Assim, observa-se que mediadores inflamatórios originados da periferia podem atravessar a barreira hematoencefálica para acometer o sistema nervoso central (SNC) (LUCAS *et al.*, 2006) e comprometer o aprendizado de habilidades importantes para o desenvolvimento infantil (MILLER *et al.*, 2013).

Evidências apontam que o excesso de peso pode impactar negativamente na estrutura, função e desenvolvimento cerebral durante a infância (MILLER & SPENCER, 2014). Um estudo recente apontou redução da substância branca e da substância cinzenta em regiões relacionadas ao controle motor e memória de trabalho em crianças obesas entre oito e 10 anos de idade (OU *et al.*, 2015). Observa-se ainda que indivíduos obesos apresentam diminuição do volume cortical, com consequente redução da função executiva (MARQUÉS-ITURRIA *et al.*, 2014). De acordo com Ou *et al.* (2015), essas alterações da estrutura cerebral relacionadas à obesidade são dependentes do tempo de exposição à inflamação. Assim, é importante verificar se crianças com excesso de peso no início da infância também já apresentam essas repercussões. Foi encontrado somente um estudo que avaliou a presença de biomarcadores inflamatórios em crianças expostas a infecções e doenças febris que viviam em condições de pobreza. Nesse estudo foi encontrado que quanto maiores as concentrações das citocinas pró-inflamatórias interleucina-1beta (IL-1 β) e IL-6 no primeiro ano de vida, menores os escores de desenvolvimento motor aos 24 meses de idade, demonstrando que a inflamação sistêmica pode acometer o desenvolvimento cerebral precocemente (JIANG *et al.*, 2014). Apesar de evidenciar a relação entre biomarcadores inflamatórios e o desenvolvimento motor, esse estudo não avaliou crianças com excesso de peso.

Além das adipocinas, biomarcadores como cortisol e fatores neurotróficos também podem influenciar importantes estruturas e funções cerebrais relacionadas com o neurodesenvolvimento infantil (GARCÍA-BUENO *et al.*, 2008; BERRY *et al.*, 2012; FORNS *et al.*, 2014; YEOM *et al.*, 2016). Estudos demonstram que alteração no funcionamento do eixo HHA está relacionada com o desenvolvimento de habilidades cognitivas (BERRY *et al.*, 2012). Elevadas concentrações de cortisol estão associadas a menores habilidades intelectuais e de leitura em crianças na idade pré-escolar e escolar (BLAIR *et al.*, 2005; BERRY *et al.*, 2012; KELLER *et al.*, 2012). Dessa forma, observa-se que a relação entre cortisol e cognição já está presente no início da infância, durante o período de rápido desenvolvimento cerebral (BLAIR *et al.*, 2011; BERRY *et al.*, 2012). Porém, não foi encontrado nenhum estudo até o momento que avaliou a associação entre as concentrações de cortisol em crianças com excesso de peso nos primeiros anos de vida.

Por fim, o BDNF também pode ser considerado um biomarcador importante relacionado com o desenvolvimento infantil. O BDNF é importante na modulação da inflamação cerebral (CALABRESE *et al.*, 2014), protegendo contra os danos neuronais associados à obesidade (HUANG *et al.*, 2014a). Assim, a redução da expressão do BDNF está associada ao déficit cognitivo e plasticidade sináptica em indivíduos obesos, bem como redução da capacidade de neuroproteção (HAN *et al.*, 2010; ARAKI *et al.*, 2014; MARQUÉS-ITURRIA *et al.*, 2014; WOSISKI-KUHN *et al.*, 2014).

Porém, poucos estudos verificaram a associação entre biomarcadores relacionados à obesidade e desfechos do desenvolvimento infantil (MILLER *et al.*, 2013; PAZ-FILHO *et al.*, 2008; FORNS *et al.*, 2014). Dessa forma, é importante avaliar se a exposição precoce aos efeitos de biomarcadores relacionados à obesidade pode interferir na organização do cérebro em desenvolvimento (MILLER *et al.*, 2014) durante este período crítico para o desenvolvimento cognitivo e motor (TAANILA *et al.*, 2005).

1.7.2 Aspectos relacionados ao desenvolvimento cognitivo e motor em crianças com sobrepeso e obesidade

Desenvolvimento infantil corresponde à capacidade progressiva do ser humano em realizar funções cada vez mais complexas (PEDRAZA & QUEIROZ, 2011). Os primeiros anos de vida constituem uma fase crítica de mudanças, na qual ocorre desenvolvimento interdependente em vários domínios do desenvolvimento. Neste período o cérebro desenvolve-se rapidamente e pequenas perturbações neste processo podem ter efeitos em longo prazo sobre sua capacidade estrutural e funcional (GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007).

A maior parte dos estudos tem avaliado os aspectos cognitivos e motores do desenvolvimento infantil separadamente. Enquanto alguns estudos avaliam a relação entre o sobrepeso e obesidade com as habilidades cognitivas (BELSKY *et al.*, 2013; MILLER & SPENCER, 2014; OU *et al.*, 2015), outros estudos enfatizam esta relação com as habilidades motoras (MOND *et al.*, 2007; D'HONDT *et al.*, 2008; D'HONDT *et al.*, 2009; NERVIK *et al.*, 2011; CASTETBON & ANDREYEVA, 2012; CHIVERS *et al.*, 2013; D'HONDT *et al.*, 2013; GENTIER *et al.*, 2013b; KHALAJ & AMRI, 2013).

Em relação aos aspectos cognitivos, estudos encontraram redução do desempenho nos testes cognitivos em crianças com excesso de peso na idade pré-escolar e escolar, que podem persistir ao longo da vida (DATAR & STURM, 2006; YU *et al.*, 2010; REINERT *et al.*,

2013; BELSKY *et al.*, 2013; GENTIER *et al.*, 2013a). Como a função intelectual na infância está relacionada à da vida adulta (BELSKY *et al.*, 2013), piores desfechos na idade pré-escolar podem levar a piores desfechos acadêmicos no futuro (DATAR & STURM, 2006).

Entretanto, autores relatam que, além do excesso de peso, vários fatores de confusão podem estar relacionados à função cognitiva, como o estímulo ambiental, a escolaridade dos pais e as práticas alimentares, portanto, esses aspectos também devem ser considerados (VELDWIJK *et al.*, 2011; GIBBS & FORSTE, 2014; CAI *et al.*, 2015). Estudos mostram que quanto maior a escolaridade materna (VELDWIJK *et al.*, 2011) e quanto melhor a qualidade das práticas alimentares, maiores as habilidades cognitivas da criança (GOLLEY *et al.*, 2013). Observa-se também efeito benéfico da amamentação na memória e desenvolvimento da linguagem no início da infância (CAI *et al.*, 2015). Além disso, um ambiente familiar que propicie diversos estímulos para as crianças é fundamental para um adequado desenvolvimento cognitivo infantil (GIBBS & FORSTE, 2014).

Já em relação aos aspectos motores, a maior parte dos estudos tem demonstrado associação inversa entre IMC e o desenvolvimento motor grosso e fino na idade pré-escolar e escolar (MOND *et al.*, 2007; D'HONDT *et al.*, 2008; D'HONDT *et al.*, 2009; NERVIK *et al.*, 2011; CASTETBON & ANDREYEVA, 2012; CHIVERS *et al.*, 2013; D'HONDT *et al.*, 2013; GENTIER *et al.*, 2013b; KHALAJ & AMRI, 2013). Cabe ressaltar que fatores como gênero, idade e nível socioeconômico podem interferir neste desfecho (TAANILA *et al.*, 2005; GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007; MOND *et al.*, 2007; D'HONDT *et al.*, 2009; SLINING *et al.*, 2010; CASTETBON & ANDREYEVA, 2012).

Evidências apontam que crianças com sobrepeso ou obesidade apresentam dificuldade em habilidades com alto gasto energético como pular e saltar (CASTETBON & ANDREYEVA, 2012), em habilidades que requerem mobilidade e força muscular (SPORIŠ *et al.*, 2014) ou em habilidades que requerem equilíbrio (CHIVERS *et al.*, 2013) e controle postural (D'HONDT *et al.*, 2008). Além disso, crianças com excesso de peso também apresentam pior desempenho em tarefas de manipulação (CHIVERS *et al.*, 2013). A principal explicação para as dificuldades no desempenho motor relaciona-se às restrições biomecânicas (D'HONDT *et al.*, 2009; CHIVERS *et al.*, 2013). Porém, observa-se que crianças obesas podem apresentar problemas na função executiva, que também limitam o desempenho motor (GENTIER *et al.*, 2013a).

É importante considerar que a limitação das habilidades motoras pode restringir as crianças com excesso de peso de participar de atividades físicas (CASTETBON & ANDREYEVA, 2012; D'HONDT *et al.*, 2013), predispondo a um estilo de vida sedentário e

futuro ganho de peso (NERVIK *et al.*, 2011). Além disso, o desenvolvimento motor no início da infância está associado à função cognitiva na infância e na vida adulta (TAANILA *et al.*, 2005; MURRAY *et al.*, 2007), o que demonstra a importância de monitorá-lo nesta faixa etária.

Até o momento, foi encontrado somente um estudo que avaliou a relação entre excesso de peso e desenvolvimento motor no início da infância (SLINING *et al.*, 2010). Os autores realizaram um estudo longitudinal entre três e 18 meses de idade e encontraram que crianças com excesso de peso apresentaram 1,8 vezes mais chance de menores escores no teste de desenvolvimento motor, quando comparadas às crianças eutróficas. Entretanto, estes autores não avaliaram o desenvolvimento cognitivo.

Além disso, nenhum estudo avaliou o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças com excesso de peso controlando as variáveis de confusão como gênero, nível socioeconômico, escolaridade materna e tempo de amamentação exclusiva. Dessa forma, é importante verificar se o excesso de peso pode comprometer o desenvolvimento cognitivo e motor em crianças entre seis e 24 meses de idade, quando estes fatores são controlados. É ainda essencial uma investigação mais detalhada a respeito da relação dos biomarcadores relacionados à obesidade com o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças nesta faixa etária.

2 JUSTIFICATIVA

O aumento da prevalência da obesidade infantil nos últimos anos ampliou a preocupação dos profissionais da área da saúde a respeito do seu impacto no futuro (KIM *et al.*, 2006). Crianças com excesso de peso no início da infância apresentam maior chance de serem obesas ao longo da vida (SKINNER *et al.*, 2010; SKILTON *et al.*, 2013) e de desenvolverem complicações associadas como doenças metabólicas e cardiovasculares (ZHU *et al.*, 2006; LANDGRAF *et al.*, 2015; GUZZETTI *et al.*, 2014).

Apesar de vários autores terem investigado a presença de biomarcadores neuroendócrino inflamatórios, bem como as consequências da obesidade na idade escolar, adolescência e vida adulta (CODONER-FRANCH *et al.*, 2014; FAIENZA *et al.*, 2012; YOSHINAGA *et al.*, 2008; VELDHORST *et al.*, 2013; DRUET *et al.*, 2012; SKILTON *et al.*, 2013), até o momento nenhum estudo avaliou se já existem repercussões do excesso de peso em crianças até os dois anos de idade. Ainda não são conhecidos dados a respeito das concentrações de adipocinas, cortisol, fator neurotrófico derivado do cérebro ou da presença de desequilíbrio redox, permanecendo uma lacuna na atual literatura sobre o impacto do excesso de peso nessa faixa etária.

Os primeiros 24 meses de vida representam um período importante para o desenvolvimento da obesidade infantil (BLAKE-LAMB *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2006). Além disso, esse período é considerado crítico para o desenvolvimento cognitivo e motor devido à ocorrência de grandes modificações na estrutura e função cerebral (JOHNSON, 2001; TAANILA *et al.*, 2005; GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007). Dessa forma, a exposição aos efeitos de biomarcadores relacionados à obesidade pode interferir na organização do desenvolvimento cerebral (MILLER *et al.*, 2015), durante este importante período de desenvolvimento infantil. É importante ainda apontar que a presença de atraso cognitivo e motor no início da infância predispõe a alterações no desenvolvimento neuropsicomotor na idade escolar (VAN BAAR *et al.*, 2009).

Portanto, além de não existir evidências se as alterações inflamatórias, neurotróficas e hormonais sistêmicas já estão presentes nesta faixa etária, não se sabe se poderiam estar associadas ao desenvolvimento cognitivo e motor nos primeiros anos de vida. A identificação precoce destas alterações pode fornecer evidências que contribuam com a elaboração de estratégias e ações a fim de prevenir ou minimizar as complicações relacionadas ao sobrepeso e obesidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as concentrações de biomarcadores neuroendócrino-inflamatórios, o estado redox e o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças com sobrepeso e obesidade entre seis e 24 meses de idade.

3.2 Objetivos específicos

Determinar as concentrações plasmáticas de adipocinas (leptina, adiponectina, resistina, sTNFR1, sTNFR2, MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 e MIG), as concentrações plasmáticas de BDNF, as concentrações séricas de cortisol e o estado redox de crianças com sobrepeso/obesidade (Estudo 1).

Avaliar o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças com sobrepeso/obesidade e verificar sua associação com variáveis antropométricas (IMC, peso corporal e comprimento corporal) (Estudo 2).

Verificar associações entre os biomarcadores neuroendócrino-inflamatórios e o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças entre seis e 24 meses de idade (Estudo 3).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo e aspectos éticos

Esse estudo apresentou desenho transversal e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), conforme parecer n. 085/12 (ANEXO 1).

4.2 População do estudo

O estudo foi realizado com crianças cadastradas nas Estratégias de Saúde da Família (ESF) do município de Diamantina, Minas Gerais.

4.2.1 Critérios de inclusão

Para ser incluída no grupo sobrepeso/obeso a criança deveria apresentar IMC por idade maior ou igual ao percentil 97, o que corresponde ao escore z score maior que +2, de acordo com os critérios da OMS (ONIS, 2006b). Para cada criança do grupo sobrepeso/obeso, uma criança com peso adequado foi incluída e pareada de acordo com o gênero, idade, nível socioeconômico, nível de escolaridade materna, tempo de amamentação exclusiva e uso de suplementação vitamínica (grupo eutrófico). As crianças do grupo eutrófico apresentavam IMC por idade maior ou igual ao percentil 3 e menor que o percentil 85, o que corresponde ao escore z maior que -2 e menor que +1. Todos os participantes foram classificados de acordo com as curvas de crescimento da OMS para crianças entre zero e cinco anos de idade e foram utilizados os pontos de corte referentes à idade e gênero (ONIS, 2006b; DE ONIS & LOBSTEIN, 2010).

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas as crianças nascidas pré-termo, com baixo peso ao nascimento, que apresentaram complicações na gestação ou no parto, com sinais de desnutrição ou alguma doença que interferisse no crescimento e desenvolvimento infantil, que utilizassem medicação, bem como aquelas que tivessem sido vacinadas ou apresentassem algum processo infeccioso (febre, gripe, diarreia, otite, etc.) nos últimos 15 dias.

4.3 Instrumentos de medidas

O IMC foi calculado baseado nas medidas de peso e comprimento corporal. Para aferição do peso corporal foi utilizada uma balança eletrônica pediátrica, com capacidade de 15 Kg e sensibilidade de 5g (Welmy, São Paulo, Brasil), sendo que as crianças foram posicionadas sentadas no centro da balança sem roupas, calçados ou fraldas. Para aferição do comprimento corporal foi utilizado um estadiômetro infantil portátil, dobrável (Seca, Hamburgo, Germany), com resolução em milímetros, no qual a criança permaneceu em decúbito dorsal em superfície plana e rígida, com a cabeça em posição reta, queixo afastado do peito, braços estendidos ao longo do corpo, pernas estendidas, calcanhares em contato com a superfície do estadiômetro, sem calçados ou adereços no cabelo. Essas medidas foram realizadas pelo mesmo examinador, devidamente treinado. Para obtenção do IMC de acordo com o sexo e a idade, bem como do escore z das variáveis peso, comprimento e IMC, foi utilizado o software WHO Anthro versão 3.2.2 (Geeva, Switzerland), desenvolvido pela OMS (WHO, 2011).

Para verificação do nível socioeconômico das famílias foi utilizado o Critério de Classificação Econômica Brasil, da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (CCEB-ABEP). Esse questionário que se baseia na acumulação de bens materiais e na escolaridade no chefe da família. O nível socioeconômico é definido pela soma dos escores que variam entre A1, A2, B1, B2, C1, C2, D e E, sendo que A1 indica a classe econômica mais elevada e E indica a menor classe econômica (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA, 2008). As classes socioeconômicas foram agrupadas em A, B, C, D e E (ANEXO 2).

Para avaliar o desenvolvimento infantil utilizou-se o *Bayley Scales of Infant and Toddler Development*, 3ª edição (Bayley-III) (ANEXO 3). O Bayley-III é um instrumento padronizado padrão ouro que avalia e identifica atraso do desenvolvimento de bebês e jovens crianças entre um e 42 meses de idade. Esse instrumento contém cinco escalas: cognitiva, linguagem, motora, social-emocional e comportamento adaptativo. Nesse estudo foram utilizadas somente as escalas cognitiva e motora, que foram avaliadas por meio da observação direta e interação com a criança. A criança recebeu um ponto para cada item realizado e zero para os itens que não foram realizados. O somatório dos itens de cada escala forneceu o escore bruto. Os escores brutos foram transformados em escores balanceados e posteriormente em escores compostos, que foram utilizados no estudo. Os escores compostos

das escalas cognitiva e motora apresentam uma média de 100 pontos e desvio-padrão de 15 pontos. Dessa forma, crianças que apresentam escores compostos inferiores a 85 pontos são classificadas como atraso do desenvolvimento (BAYLEY, 2006).

4.4 Procedimentos

Inicialmente foi realizada uma visita à Secretaria Municipal de Saúde de Diamantina, na qual os objetivos e procedimentos do estudo foram esclarecidos e a permissão para a realização do estudo nas ESF foi solicitada. Durante a visita às ESF foi realizado um levantamento com os Agentes Comunitários de Saúde de todas as crianças até os 24 meses de idade. Em seguida realizou-se uma visita no domicílio de cada criança para explicitar aos pais e/ou responsáveis os objetivos e procedimentos do estudo. Aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Após a assinatura do TCLE os pais e/ou responsáveis responderam algumas perguntas elaboradas em forma de questionário sobre idade, gênero, duração da amamentação exclusiva, uso de suplemento vitamínico e outros medicamentos, bem como outras questões de saúde da criança e da família (APÊNDICE B). Além disso, foi aplicada a escala CCEB-ABEP para avaliação do nível socioeconômico.

Todas as crianças foram avaliadas no mesmo local, no laboratório de Pediatria, do Departamento de Fisioterapia da UFVJM. Inicialmente foi aferido o peso e o comprimento corporal das crianças, bem como identificado o IMC. Após essas medidas, a criança foi avaliada através do teste Bayley-III, no mesmo local. O teste foi administrado individualmente, de forma padronizada, com a utilização do kit específico. O tempo de aplicação variou entre 50 e 90 minutos, de acordo com a idade da criança. Os pesquisadores passaram primeiro por um treinamento para aplicação dos testes e foi estabelecida a confiabilidade inter-examinador ($ICC = 0,98 - 0,99$).

Vinte e quatro horas após essa avaliação inicial, seis mililitros de amostras de sangue foram coletadas após 3 horas de jejum, pela manhã, em um laboratório do município. Os tubos de heparina sódica e de soro foram centrifugados para remover as células e os debris e alíquotas de plasma, soro e eritrócitos foram armazenadas no freezer -80°C até a realização das análises das concentrações dos biomarcadores plasmáticos, séricos e do estado redox.

4.4.1 Avaliação das concentrações plasmáticas das adipocinas e do BDNF

As concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina, resistina, BDNF e receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) foram analisadas utilizando kits convencionais de ELISA sanduíche (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado um protocolo padronizado, sendo que em cada poço foram adicionados 100µL de anticorpo monoclonal contra o biomarcador a ser dosado, que foi diluído em PBS 1x e incubado por 12 horas. Após sucessivas lavagens, as placas foram bloqueadas com 200µL/poço de uma solução contendo PBS - BSA 1%, durante duas horas a 37°C. Após bloqueio, as placas foram lavadas e foram adicionadas 100µL das amostras e do padrão em para cada poço, que permaneceram incubadas por 12 horas. Posterior à incubação, foi realizada nova lavagem da placa e os anticorpos secundários biotinilados foram diluídos em PBS – BSA 0,1% e incubados por duas horas à temperatura ambiente. Então, 100µL de estreptoavidina ligada a peroxidase foram diluídos em PBS – BSA 0,1% e foram adicionadas à placa, mantida sobre agitação por 30 minutos. Quatro miligramas do cromógeno OPD (0-phenylenediamine) foram diluídos em 10 mL de tampão citrato e adicionados 100µL em cada poço, juntamente com a água oxigenada de 30 volumes (H₂O₂ - 2µL/placa) para catalisar a reação. Após vinte minutos de incubação em ausência de luz a reação foi interrompida adicionando-se ácido sulfúrico (H₂SO₄, 1M; 50µL/poço) para em seguida realizar a leitura da intensidade de marcação em espectrofotômetro a 490 nm (SOFTmaxPro – versão 2.2.1). Os dados foram expressos em pg/mL e os limites de detecção foram de 5,0 pg/mL para todos os kits.

As concentrações plasmáticas de quimiocinas foram analisadas através de microesferas pela técnica denominada *cytometric bead arrays* (CBA), que permite a quantificação simultânea de várias proteínas no mesmo teste, conforme as instruções do fabricante (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Foi utilizado o kit para quantificação de quimiocinas *Human Chemokine* - MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 e MIG. Resumidamente, as amostras de plasma foram incubadas com as microesferas de captura recobertas por anticorpos específicos para as respectivas quimiocinas, assim como as proteínas da curva padrão. Adicionou-se em seguida o reagente de cor (Ficoeritrina - PE) e as amostras foram incubadas por 3 horas. Após a incubação, as amostras foram lavadas (*Wash buffer*®) e centrifugadas (200 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as microesferas foi ressuspensionado com 300µL de *Wash buffer*. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA) e os resultados foram analisados pelo software FCAP Array v1.0.1 (Soft

Flow Inc.) e representados em pg/mL. Os limites de detecção foram 2,7 pg/mL para MCP-1, 1,0 pg/mL para RANTES, 0,2 pg/mL para IL-8, 2,8 pg/mL para IP-10 e 0,2 pg/mL para MIG.

4.4.2 Avaliação das concentrações séricas de cortisol

As concentrações sérias de cortisol foram mensuradas por meio do kit ELISA (IBL, AMERICA, Minneapolis, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse ensaio é baseado no princípio de ligação competitiva, no qual a molécula de cortisol da amostra compete com a molécula de cortisol ligado à peroxidase e conjugada a um anticorpo. Dessa forma, a intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de cortisol da amostra. O ensaio foi realizado em microplacas revestidas com o anticorpo monoclonal anti-cortisol. Foram adicionadas 20µL de cada concentração padrão do kit e das amostras e, posteriormente, 200µL da enzima conjugada à peroxidase em cada poço. A placa foi incubada por 60 minutos e foram realizadas lavagens sucessivas. Foram então adicionados 100µL da solução do substrato em cada poço e a placa foi incubada por mais 15 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 100µL da solução *stop* em cada poço e, em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm (SOFTmaxPro – versão 2.2.1). Os dados foram expressos em nmol/L e o limite de detecção foi de 55,2 nmol/L.

4.4.3 Avaliação do estado redox

O estado redox foi determinado pela avaliação da concentração de TBARS, da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e da capacidade antioxidante total no lisado eritrocitário das amostras coletadas.

O lisado eritrocitário foi preparado como descrito por Glass e Gershon (1981). Para essa finalidade, 450µL (1,5 vezes o volume de eritrócitos) de tampão fosfato de potássio (5mM, pH 7,0) foram adicionados a 300µL de eritrócitos. A suspensão foi congelada e descongelada 3 vezes, e na sequência centrifugada a 12.000xg, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Logo após, à 340µL do sobrenadante do lisado eritrocitário foram acrescentados 425µL (1,25 vezes o volume de sobrenadante) de clorofórmio e etanol gelados e 600µL (2 vezes o volume do sobrenadante) de tampão fosfato de potássio (5mM, pH 7,0), essa mistura foi centrifugada a 12.000xg, por 30 minutos. O sobrenadante do lisado eritrocitário foi utilizado para análise da concentração de TBARS, da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e da capacidade antioxidante total.

A reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA foi utilizada para determinar a peroxidação lipídica em células e tecidos. A concentração de TBARS foi mensurada de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). Alíquotas de lisado eritrocitário (0,3 mL) foram adicionadas em 250 μ L de ácido acético 2,5M (pH 3,4) e a 250 μ L ácido tiobarbitúrico 0,8%. Após o resfriamento, foi feita a análise, em duplicata, no leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA) à 532nm. A concentração de TBARS, expressa em nmol de MDA/mg proteína, foi determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de MDA (1,1,3,3-tetramethoxypropane) (Sigma, USA).

O ensaio para determinar a atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi realizado de acordo com Srivastava *et al.*, (2007). Foi adicionado 1mL de tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,8) contendo 1mM de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) a 0,05mL do lisado eritrocitário. A reação foi iniciada com a adição do pirogalol (0,2mM). A leitura foi realizada durante 4 minutos à 37°C no leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA), a 420 nm, em duplicata. A atividade da enzima, expressa em U/mg de proteína, foi determinada a partir da capacidade da SOD em inibir a autooxidação do pirogalol, onde 1U = 50% de inibição da autooxidação do pirogalol.

O ensaio da CAT (EC 1.11.1.6) foi realizado conforme o método de Nelson & Kiesov (1972), com algumas modificações. Foram adicionados 1,4 mL de tampão fosfato (50mM, pH 7,0) em uma alíquota (0,02mL) do lisado eritrocitário, e em seguida adicionado 0,05mL de substrato (H_2O_2 , 3M). A leitura foi realizada durante 1 minuto à 25°C em espectrofotômetro a 240nm (Libra S22 spectrophotometer, Bochrom, UK), em duplicata. Este procedimento evita a possível interferência associada com a atividade da GPx, uma vez que os cofatores necessários não estão presentes no meio da reação. A atividade da CAT foi expressa em $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, sendo que ΔE corresponde a variação da atividade da enzima durante um minuto.

O ensaio da capacidade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP) foi realizado de acordo com Benzie e Strain (1996). A capacidade de redução do complexo da forma férrica Fe^{3+} -TPTZ (Ferri-tripiridiltriazina) para a ferrosa Fe^{2+} - (ferroso-tripiridiltriazina) dos antioxidantes, em pH ácido, define seu poder antioxidante. Para a confecção do reagente FRAP, 25mL de tampão acetato de sódio (0,3M, pH 3,6) foi acrescentado a 2,5 mL de TPTZ (10Mm) e depois misturado a 2,5 mL de $FeCl_3 \cdot H_2O$ (20Mm). A uma alíquota de 528 μ L do reagente FRAP foram adicionados 72 μ L de lisado eritrocitário. Essa mistura foi homogeneizada e incubada no escuro, a 37° por 30 minutos. Depois de resfriada por 10 minutos as amostras foram analisadas em duplicata, em leitor de

microplacas (SpectranMax®190, 34 Molecular Devices, EUA), a 593nm. A capacidade antioxidante total foi determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de FeSO₄ e normalizada pela quantidade de proteína na amostra, resultados expressos como µg FeSO₄/mg de proteína.

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando-se a albumina de soro bovino (BSA) (1mg/mL) como padrão. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (SpectranMax®190, 34 Molecular Devices, EUA) e os valores de proteína, em mg/mL, determinados pelo software Softmaxpro® (V5.4, Molecular Devices, EUA).

4.5 Análise estatística

Os dados coletados foram organizados em três estudos e foram analisados pelo pacote estatístico SPSS, versão 17.0 (Inc., USA) e pelo *software GraphPad Prism*, versão 5.0 (Inc., USA). Foi adotado nível de significância de 5% ($\alpha < 0,05$).

4.5.1 Estudo 1

Inicialmente foi realizada estatística descritiva e foram utilizados o teste qui-quadrado e teste exato de *Fisher* para comparar a proporção dos grupos sobrepeso/obeso e eutrófico. Os testes de *Shapiro-Wilk* e de *Levene* foram aplicados para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. Transformação em log foram adotadas para normalizar os resultados das variáveis BDNF, sTNFR1, sTNFR2, MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10, MIG, TBARS, CAT, SOD e FRAP. Por fim, o teste t para amostras independentes foi realizado para comparar os grupos e correlação de Pearson foi utilizada para verificar a associação entre os biomarcadores em cada grupo.

Nesse estudo, uma amostra de 50 participantes (25 no grupo sobrepeso/obeso e 25 no grupo eutrófico) foi necessária para identificar um tamanho do efeito mínimo de 0.34, com poder estatístico de 90% e valor de alfa de 0,05 para as variáveis leptina, adiponectina, resistina, BDNF, sTNFR1, sTNFR2, MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 e MIG. Já para obter um poder estatístico de 90% e um valor de alfa de 0,05 para a variável cortisol foram necessários 20 participantes em cada grupo e para as variáveis TBARS, CAT, SOD e FRAP foram necessários 18 participantes em cada grupo.

4.5.2 Estudo 2

Inicialmente foi realizada estatística descritiva para caracterização da amostra, bem como o teste Qui-quadrado ou Teste Exato de *Fisher* para comparação entre as proporções dos dois grupos. As variáveis numéricas foram transformadas em log e foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk* para verificar a normalidade dos dados e o teste de *Levene* para verificar a homogeneidade da variância. Foi realizado o teste t para amostras independentes para comparar os grupos e a magnitude do efeito e o poder estatístico foram verificados para os escores compostos cognitivo e motor. Foi também utilizada correlação de *Spearman* para verificar a associação entre as variáveis antropométricas (IMC, peso corporal e comprimento corporal) com o escore composto cognitivo e motor. A correlação entre as variáveis foi considerada de acordo com Portney e Watkins (1999), em que valores de correlação entre 0,00 e 0,25 representam pouca ou nenhuma associação entre as variáveis, entre 0,25 a 0,50 fraca associação, entre 0,50 e 0,75 moderada associação e acima de 0,75 forte associação.

Devido à escassez de estudos a respeito do desenvolvimento infantil entre seis e 24 meses de idade, foi realizado inicialmente um estudo piloto com 11 crianças em cada grupo para obtenção do cálculo amostral. Foi identificada diferença mínima significativa entre os grupos de 1,27 e desvio-padrão de 2,38 na variável escore cognitivo composto, sendo necessários 28 indivíduos em cada grupo para compor a amostra.

4.5.3 Estudo 3

Inicialmente foram realizados testes de correlação de *Spearman* ou *Pearson* para verificar a associação de todos os biomarcadores estudados (variáveis independentes) com os escores compostos cognitivo e motor (variáveis dependentes). Posteriormente, foi realizada análise de regressão simples entre as variáveis dependentes e as variáveis independentes que apresentaram valor $p < 0,20$. Por fim, modelos de regressão linear *stepwise* com e sem ajuste pela idade e gênero foram utilizados para verificar a associação entre os biomarcadores selecionados e os escores compostos cognitivo e motor.

5 RESULTADOS

Foram identificadas 478 crianças cadastradas nas ESF do município de Diamantina nos primeiros dois anos de vida no período de outubro de 2013 a dezembro de 2014. A figura 6 demonstra o fluxograma das crianças participantes em cada grupo do estudo.

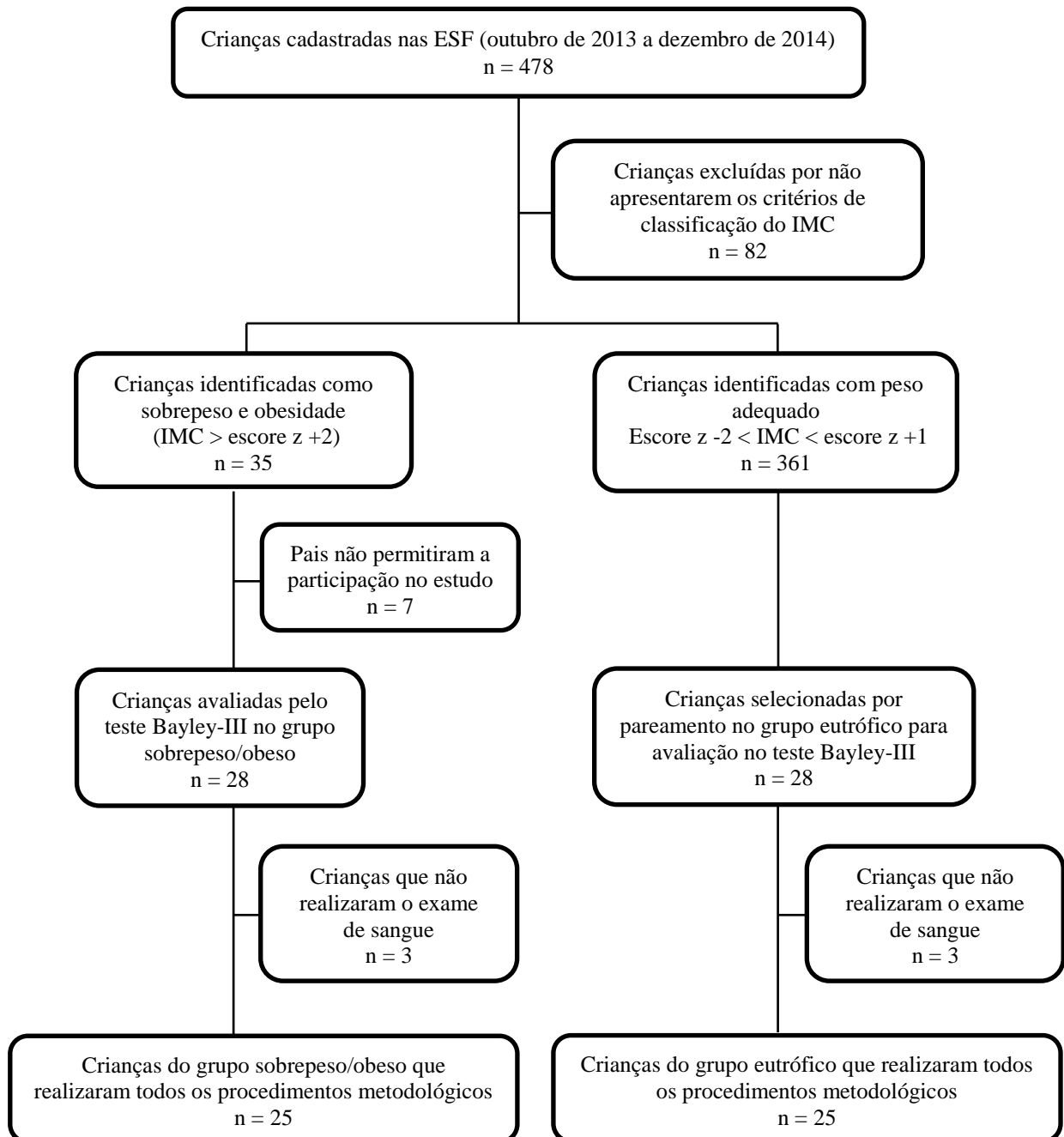


Figura 6. Fluxograma das crianças participantes em cada grupo do estudo.

5.1 Estudo 1

5.1.1 *Características dos participantes*

Para esse estudo foram avaliados 50 participantes, sendo 25 do grupo sobrepeso/obeso e 25 do grupo eutrófico. Trinta e duas crianças eram do gênero masculino e 18 do gênero feminino. Dentre as crianças com sobrepeso/obeso, 19 foram classificadas como sobrepeso e seis como obesas.

Os grupos apresentaram características similares em relação ao gênero, nível socioeconômico, escolaridade materna, tempo de amamentação exclusiva, uso de suplementos vitamínicos, idade e comprimento corporal ($p>0,05$). Já os valores do peso corporal e do IMC foram significativamente mais altos no grupo sobrepeso/obeso ($p<0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização da amostra

Característica da amostra		Eutróficos (n=25)	Sobrepeso/obeso (n=25)	P
Gênero	F(%)			1,00 ^a
Masculino		16 (50,0%)	16 (50,0%)	
Feminino		9 (50,0%)	9 (50,0%)	
Nível socioeconômico	F(%)			1,00 ^b
B		4 (57,1%)	3 (42,9%)	
C		17 (50,0%)	17 (50,0%)	
D		4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Escolaridade materna	F(%)			0,76 ^b
Fundamental 2 incompleto		4 (57,1%)	3 (42,9%)	
Médio incompleto		7 (51,3%)	5 (41,7%)	
Superior incompleto		13 (48,1%)	14 (51,9%)	
Superior completo		1 (25,0%)	3 (75,0%)	
Amamentação exclusiva até os seis meses de idade	F(%)			0,57 ^a
Sim		10 (43,5%)	13 (56,5%)	
Não		15 (55,6%)	12 (44,4%)	
Suplementação vitamínica	F(%)			1,00 ^b
Sim		4 (50,0%)	4 (50,0%)	
Não		21 (50,0%)	21 (50,0%)	
Idade (dias)				0,99 ^c
Média (±EPM)		357,88 (±30,07)	358,00 (±29,91)	
Peso corporal (Kg)				0,0001 ^{c*}
Média (±EPM)		8,97 (±0,32)	12,19 (±0,55)	
Comprimento corporal (cm)				0,28 ^c
Média (±EPM)		73,30 (±1,43)	75,55 (±1,52)	
IMC (Kg/m ²)				0,0001 ^{c*}
Média (±EPM)		16,62 (±0,21)	21,04 (±0,23)	

F, frequência; IMC, índice de massa corporal; EPM, erro padrão da média.

^aQui-quadrado; ^bTeste exato de Fisher; ^cTeste t para amostras independentes.

*Diferença significativa (p<0,05).

5.1.2 Concentrações dos biomarcadores plasmáticos e séricos

As concentrações plasmáticas de leptina ($p=0,0001$; IC 95%: -1164, -404,6), adiponectina ($p=0,0007$; IC 95%: -6289, -1810) e dos valores logarítmicos do BDNF ($p=0,003$; IC 95%: -0,37, -0,08) foram significativamente maiores no grupo sobrepeso/obeso quando comparadas ao grupo eutrófico. O cortisol sérico também apresentou maiores concentrações no grupo sobrepeso/obeso ($p=0,048$; IC 95% CI: -136,4, -0,47). Porém, não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos em relação aos valores de resistina ($p=0,90$; IC 95%: -299,4, 263,3) (Figura 7).

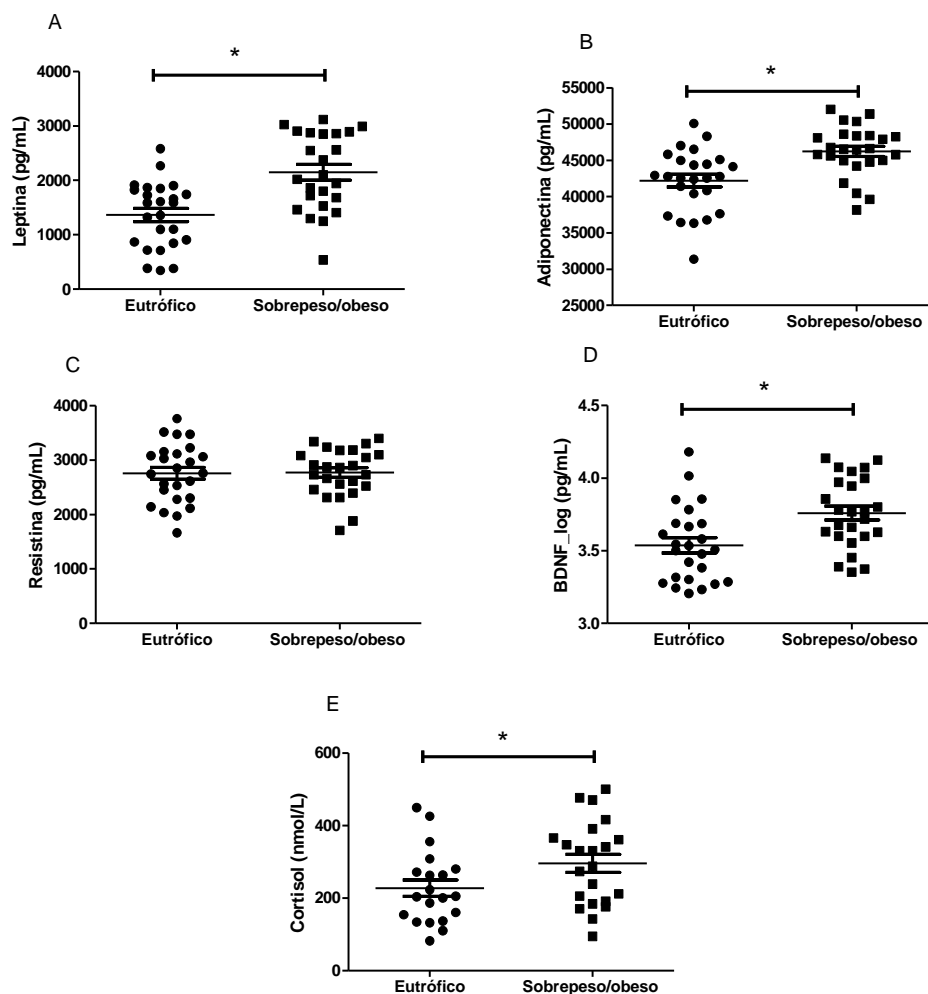


Figura 7. Concentrações plasmáticas de leptina, adiponectina, resistina, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e cortisol sérico nos grupos eutrófico e sobrepeso/obeso. A-D: $n=25$ em cada grupo. D: BDNF foi representado em log. E: $n=22$ no grupo sobrepeso/obeso e $n=20$ no grupo eutrófico. Valores foram representados como média \pm EPM. *Diferença significativa ($p<0,05$).

As concentrações logarítmicas dos receptores solúveis do TNF [sTNFR1 ($p=0,92$; IC 95%: -0,08, 0,07) e sTNFR2 ($p=0,32$; IC 95%: -0,03, 0,09)] e das quimiocinas [MCP-1 ($p=0,13$; IC 95%: -0,04, 0,27), RANTES ($p=0,06$; IC 95%: -0,26, 0,01), IL-8 ($p=0,79$; CI 95%: -0,14, 0,18), IP-10 ($p=0,06$; IC 95%: -0,31, 0,01) e MIG ($p=0,27$; IC 95%: -0,40, 0,12)] não diferiram significativamente entre os grupos (Figura 8).

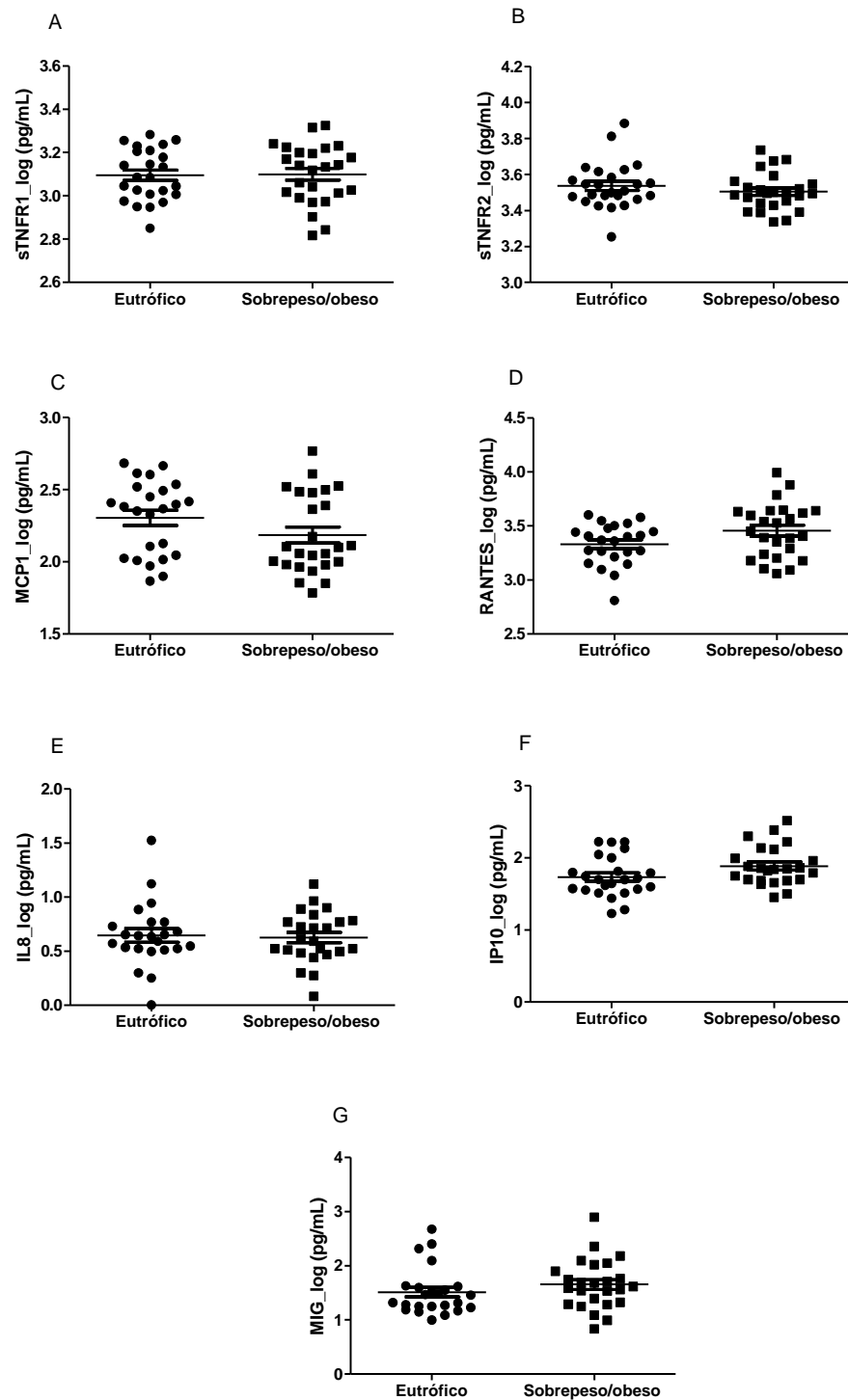


Figura 8. Concentrações plasmáticas das quimiocinas (MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 e MIG) e dos receptores solúveis do TNF (sTNFR1 e sTNFR2) em crianças eutróficas e com sobrepeso/obesidade. A-G: n=25 em cada grupo. Valores foram representados como média±EPM.

5.1.3 Concentração de TBARS, atividade das enzimas CAT e SOD e capacidade antioxidante total.

Em relação ao estado redox, foi encontrada diferença significativa nas concentrações de TBARS ($p=0,004$; IC 95%: 0,10, 0,49) e na atividade das enzimas SOD ($p=0,02$; IC 95%: 0,03, 0,41) e CAT ($p=0,045$; IC 95%: 0,003, 0,34), sendo que as crianças do grupo sobrepeso/obeso apresentaram menores valores quando comparadas aos pares eutróficos. Não foi encontrada diferença significativa na capacidade antioxidante total (FRAP) entre os grupos ($p=0,59$; IC 95%: -0,21, 0,36) (Figura 9).

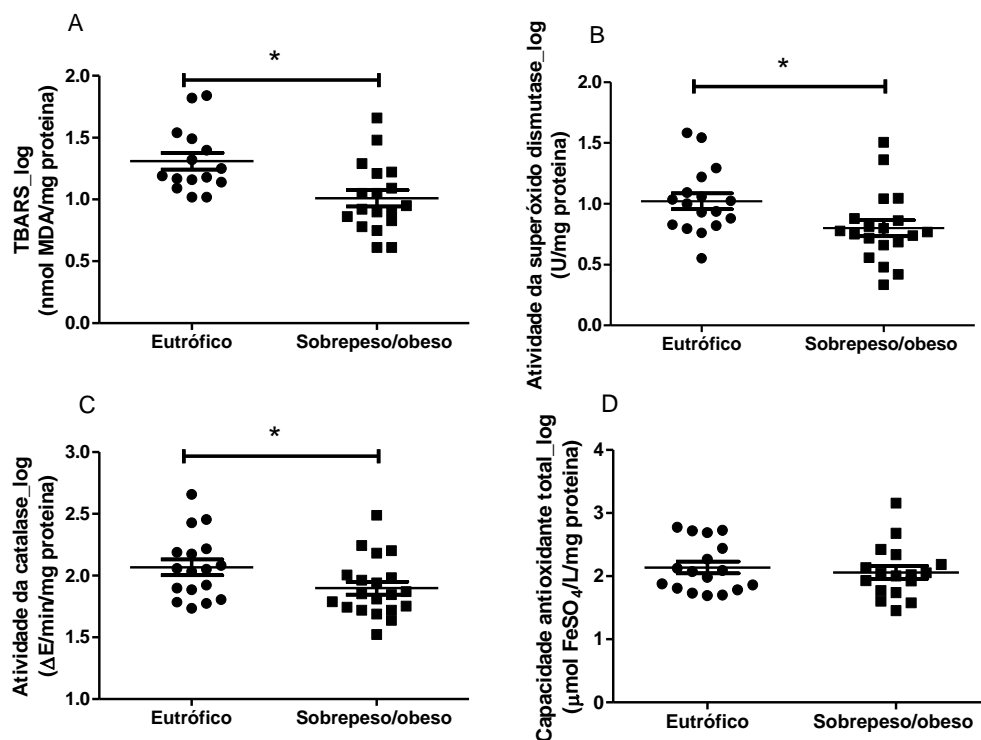


Figura 9. Estado redox em crianças eutróficas e com sobrepeso/obesidade. A-D: n=18 em cada grupo. Valores expressos em log e representados como média±EPM. *Diferença significativa ($p<0,05$).

5.1.4 Correlação entre os biomarcadores analisados

Em crianças com sobrepeso/obesidade, as concentrações plasmáticas de adiponectina foram inversamente associadas com as concentrações plasmáticas de leptina ($p=0,02$), sTNFR1 ($p=0,03$) e IL8 ($p=0,008$). Foi também encontrada associação negativa das concentrações séricas de cortisol com as concentrações plasmáticas de sTNFR1 ($p=0,04$) e MCP-1 ($p=0,02$). As concentrações plasmáticas de BDNF foram positivamente associadas com as concentrações de sTNFR1 ($p=0,03$), MCP-1 ($p=0,03$), IL-8 ($p=0,009$) e IP-10 ($p=0,04$). Foram encontradas também associações positivas entre vários biomarcadores com papel pró-inflamatório: leptina e sTNFR1 ($p=0,02$); resistina e sTNFR2 ($p=0,03$); sTNFR1 e sTNFR2 ($p=0,007$); sTNFR2 e IP-10 ($p=0,02$); IL8 e RANTES ($p=0,04$); MIG e RANTES ($p=0,01$); MIG e IL-8 ($p=0,007$) e; IP-10 e MIG ($p=0,0001$). Por fim, as concentrações de TBARS foram positivamente associadas com a atividade das enzimas SOD ($p=0,04$) e CAT ($p=0,03$); e a defesa antioxidante também foi positivamente associada [SOD e CAT ($p = 0,0001$); SOD e FRAP ($p=0,0001$) e; CAT e FRAP ($p=0,0001$)] (Tabela 2).

Já no grupo eutrófico, foram observadas associações positivas entre as concentrações plasmáticas de biomarcadores com papel pró-inflamatório: resistina e IP-10 ($p=0,02$); resistina e MIG ($p=0,03$); sTNFR1 e sTNFR2 ($p=0,0001$); sTNFR1 e IP-10 ($p=0,01$); sTNFR1 e MIG ($p=0,02$); sTNFR2 e MIG ($p=0,007$); IL-8 e MIG ($p=0,002$); IP-10 e MIG ($p=0,02$). Foi demonstrada ainda associação positiva entre as concentrações de TBARS e a atividade das enzimas SOD ($p=0,0001$) e CAT ($p=0,02$). A atividade das enzimas SOD e CAT foram positivamente associadas ($p=0,04$), assim como a atividade da CAT foi positivamente associada com a capacidade antioxidante total (FRAP) ($p=0,03$). Foi ainda evidenciada associação positiva entre FRAP e BDNF ($p=0,03$) (Tabela 3).

Tabela 2. Associação entre os biomarcadores analisados no grupo sobrepeso/obeso (n=25).

Biomarcadores	LEP	ADIPO	BDNF	CORT	RES	sTNFR1	sTNFR2	MCP-1	RANTES	IL-8	IP-10	MIG	TBARS	SOD	CAT	FRAP
LEP	-															
ADIPO	-0,61*	-														
BDNF	0,10	0,15	-													
CORT	-0,20	0,13	-0,36	-												
RES	0,14	-0,22	0,15	-0,36	-											
sTNFR1	0,46*	-0,45*	0,43*	-0,44*	0,20	-										
sTNFR2	0,25	-0,12	0,25	-0,39	0,43*	0,52*	-									
MCP-1	-0,15	0,02	0,44*	-0,49*	0,11	0,10	0,06	-								
RANTES	-0,31	-0,02	0,34	-0,25	0,07	0,32	0,24	0,18	-							
IL-8	-0,40	-0,53*	0,52*	-0,12	-0,13	0,08	0,21	0,24	0,41*	-						
IP-10	0,003	0,35	0,42*	-0,21	0,03	0,26	0,46*	0,14	0,32	0,38	-					
MIG	-0,25	0,27	0,31	-0,10	-0,04	0,16	0,33	0,29	0,50*	0,54*	0,83*	-				
TBARS	0,07	0,28	0,30	-0,48	-0,10	0,15	0,12	0,02	0,30	0,16	0,18	0,11	-			
SOD	0,10	0,06	-0,04	-0,61	-0,08	0,24	0,34	0,36	0,30	0,23	0,26	0,06	0,52*	-		
CAT	-0,18	0,32	0,04	-0,36	-0,07	0,005	0,17	0,22	0,22	0,54*	0,28	0,18	0,54*	0,84*	-	
FRAP	-0,10	0,32	0,24	-0,39	-0,30	0,20	0,48	0,44	0,11	0,59*	0,37	0,28	0,37	0,83*	0,82*	-

Correlação de Pearson, *Correlação significativa (p<0,05).

Tabela 3. Associação entre os biomarcadores analisados no grupo eutrófico (n=25).

Biomarcadores	LEP	ADIPO	BDNF	CORT	RES	sTNFR1	sTNFR2	MCP-1	RANTES	IL-8	IP-10	MIG	TBARS	SOD	CAT	FRAP
LEP	-															
ADIPO	0,30	-														
BDNF	-0,06	0,12	-													
CORT	-0,30	0,05	-0,22	-												
RES	-0,15	0,14	0,32	-0,18	-											
sTNFR1	0,17	0,37	0,11	0,04	0,34	-										
sTNFR2	-0,18	0,16	-0,36	0,12	0,07	0,67*	-									
MCP-1	-0,06	-0,03	0,15	0,06	0,06	-0,32	-0,27	-								
RANTES	-0,11	-0,12	0,37	-0,18	-0,05	-0,23	-0,29	0,21	-							
IL-8	-0,40	-0,006	0,04	0,28	0,31	0,24	0,38	0,16	0,33	-						
IP-10	-0,04	0,10	0,16	-0,26	0,59*	0,51*	0,33	0,16	-0,11	0,25	-					
MIG	-0,33	0,03	-0,15	0,28	0,46*	0,47*	0,53*	-0,004	-0,36	0,60*	0,48*	-				
TBARS	-0,51	-0,28	-0,32	-0,01	-0,02	0,03	0,42	0,03	-0,55	0,14	0,21	0,35	-			
SOD	-0,04	-0,12	-0,44	-0,16	-0,03	0,25	0,53*	-0,009	0,63*	0,21	0,40	0,49	0,85*	-		
CAT	-0,24	0,10	0,15	-0,09	0,04	-0,15	0,05	0,19	-0,60*	-0,24	0,14	0,25	0,67*	0,53*	-	
FRAP	-0,18	-0,26	0,56*	-0,39	0,25	0,27	0,13	0,09	-0,24	-0,16	0,43	0,31	0,51	0,27	0,58*	-

Correlação de Pearson, *Correlação significativa (p<0,05).

5.2 Estudo 2

Para esse estudo foram avaliadas 56 crianças, sendo 28 do grupo sobrepeso/obeso e 28 do grupo eutrófico. Vinte e duas crianças eram do gênero feminino e 34 do gênero masculino. Dentre as crianças do grupo sobrepeso/obeso, 22 eram classificadas como sobrepeso e seis como obesas. Dados referentes à estatística descritiva e comparativa das principais características dos grupos avaliados foram apresentados na Tabela 4.

Como esperado, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos em relação à idade, gênero, nível socioeconômico, escolaridade materna e amamentação exclusiva até os seis meses de idade ($p > 0,05$). Já o peso corporal e o IMC foram significativamente maiores para o grupo sobrepeso/obeso em relação ao grupo eutrófico (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização dos grupos eutrófico e sobrepeso/obeso.

Caracterização da amostra		Eutrófico (n=28)	Sobrepeso/obeso (n=28)	P
Gênero	F(%)			1,00 ^a
Masculino		17 (50,0%)	17 (50,0%)	
Feminino		11 (50,0%)	11 (50,0%)	
Nível socioeconômico	F(%)			1,00 ^b
B		4 (50,0%)	4 (50,0%)	
C		20 (51,3%)	19 (48,7%)	
D		4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Escolaridade materna	F(%)			0,85 ^b
Fundamental 2 incompleto		4 (57,1%)	3 (42,9%)	
Médio incompleto		7 (53,8%)	6 (46,2%)	
Superior incompleto		16 (50,0%)	16 (50,0%)	
Superior completo		1 (25,0%)	3 (75,0%)	
Amamentação exclusiva até os seis meses de idade	F(%)			0,59 ^a
Sim		12 (46,2%)	14 (53,8%)	
Não		16 (53,3%)	14 (46,7%)	
Idade (dias)				0,99 ^c
Média (±DP)		362,64 (±159,05)	362,96 (±159,05)	
Peso corporal (Kg)				0,0001 ^{c*}
Média (±DP)		8,99 (±1,59)	12,13 (±2,68)	
Comprimento corporal (cm)				0,27 ^c
Média (±DP)		73,34 (±7,24)	75,49 (±7,44)	
IMC (Kg/m ²)				0,0001 ^{c*}
Média (±DP)		16,65 (±1,07)	20,99 (±1,13)	

F, frequência; IMC, índice de massa corporal.

^aQui-quadrado; ^bTeste exato de Fisher; ^cTeste t para amostras independentes.

*Diferença significativa (p<0,05).

Foi encontrada diferença significativa nos escores compostos cognitivo e motor entre os grupos, sendo que as crianças do grupo sobrepeso/obeso apresentaram menores escores compostos quando comparadas às crianças eutróficas (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação dos escores compostos cognitivo e motor entre os grupos eutrófico e sobrepeso/obeso.

Escores compostos	Eutrófico	Sobrepeso/obeso	p	IC 95%
Cognitivo	106,25 ($\pm 8,35$)	100,89 ($\pm 9,72$)	0,03*	[0,50-10,22]
Motor	102,14 ($\pm 9,86$)	96,43 ($\pm 10,75$)	0,04*	[0,18-11,24]

Valores apresentados em média e desvio-padrão.

IC, intervalo de confiança.

*Diferença significativa ($p < 0,05$), teste t para amostras independentes.

O cálculo do poder estatístico foi realizado considerando uma magnitude do efeito de 0,59 e 0,55 para os escores compostos cognitivo e motor, respectivamente, com um valor alfa de 0,05. Foi encontrado poder estatístico de 60% para o escore composto cognitivo e de 55% para o escore composto motor, demonstrando que a diferença encontrada entre os grupos foi moderada.

Todas as crianças do grupo eutrófico apresentaram escores compostos dentro dos valores médios esperados pelo teste (100 ± 15). Uma criança (3,6%) do grupo sobrepeso/obeso apresentou escore composto cognitivo inferior à média do teste e quatro crianças (14,3%) do grupo sobrepeso/obeso apresentaram escore composto motor inferior à média do teste (inferior a 85), sendo classificadas como atraso do desenvolvimento.

Foi verificada também associação significativa negativa fraca entre o peso corporal e o comprimento corporal com o desenvolvimento cognitivo, bem como do IMC com o desenvolvimento motor. Não foi identificada correlação significativa entre o IMC e o desenvolvimento cognitivo, bem como do comprimento corporal com o desenvolvimento motor (Figura 10).

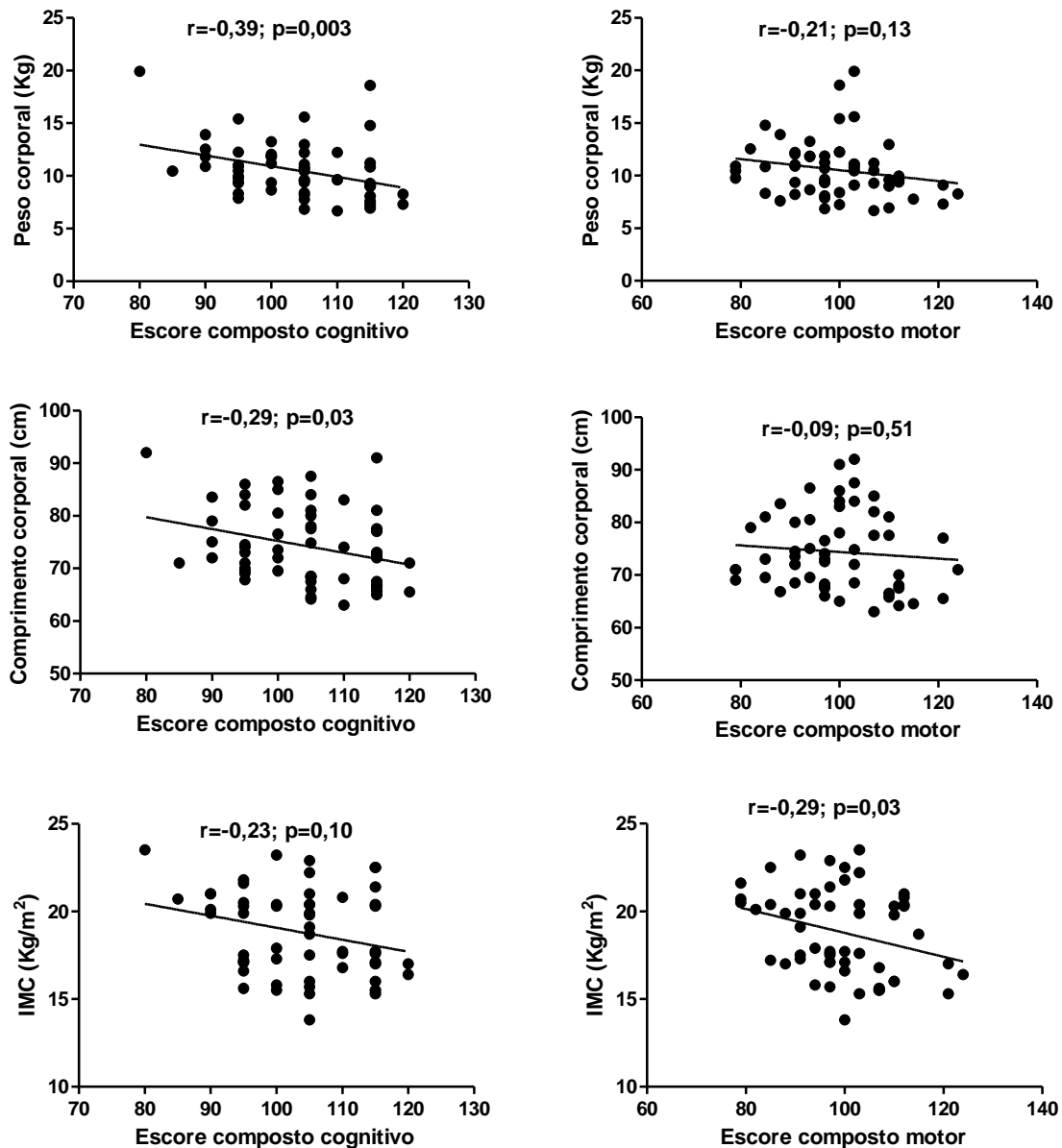


Figura 10. Correlação entre parâmetros antropométricos (peso corporal, comprimento corporal e IMC) com os escores compostos cognitivo e motor.

5.3 Estudo 3

Para esse estudo foram avaliadas 50 crianças (25 do grupo sobrepeso/obeso e 25 do grupo eutrófico). Dentre os 16 biomarcadores avaliados no plasma, soro e no lisado eritrócitário, quatro biomarcadores foram associados com o escores compostos cognitivos: leptina (*Spearman* $r = -0,29$; $p = 0,04$); sTNFR1 (*Spearman* $r = 0,52$; $p = 0,0001$); sTNFR2 (*Spearman* $r = 0,26$; $p = 0,07$) e IL8 (*Spearman* $r = 0,23$; $p = 0,11$). Em relação aos escores

compostos motores, seis biomarcadores apresentaram associação: sTNFR1 (*Pearson* $r=0,39$; $p=0,005$); sTNFR2 (*Pearson* $r=0,35$; $p=0,01$); RANTES (*Pearson* $r=-0,22$; $p=0,13$); SOD (*Pearson* $r=0,31$; $p=0,08$), CAT (*Pearson* $r=0,39$; $p=0,03$) e FRAP (*Pearson* $r=0,30$; $p=0,12$). Dessa forma, esses biomarcadores foram selecionados para realizar a análise de regressão linear simples, apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Análise de regressão linear simples com os escores compostos cognitivo e motor.

Biomarcadores	Escore composto cognitivo		Escore composto motor	
	β	p	β	p
Leptina	-0,30	0,04*	-	-
sTNFR1	0,49	0,0001*	0,41	0,003*
sTNFR2	0,35	0,01*	0,38	0,006*
IL8	0,18	0,21	-	-
RANTES	-	-	-0,17	0,25
SOD	-	-	0,31	0,08
CAT	-	-	0,39	0,03*
FRAP	-	-	0,30	0,11

β , coeficiente de regressão padronizado.

*Diferença significativa ($p<0,05$).

Os resultados da Tabela 6 demonstraram que somente os biomarcadores leptina, sTNFR1 e sTNFR2 foram significativamente associados com os escores compostos cognitivos ($p<0,05$) e os biomarcadores sTNFR1, sTNFR2 e CAT foram significativamente associados com os escores compostos motores ($p<0,05$).

Foram então testados modelos de regressão linear múltipla *stepwise*. Foi demonstrada associação significativa das concentrações plasmáticas de leptina e sTNFR1 com os escores compostos cognitivos, sendo que essas duas variáveis independentes juntas explicaram 37% da variabilidade dos escores compostos cognitivos ($p=0,001$). Porém, somente as concentrações plasmáticas de sTNFR1 foram associadas e explicaram 24% da variabilidade dos escores compostos motores ($p=0,003$) (Tabela 7).

Assim, elevadas concentrações plasmáticas de leptina foram negativamente associadas, sendo que o aumento de 1 pg/mL de leptina reduz 0,40 pontos no escore composto cognitivo. Já as concentrações plasmáticas de sTNFR1 foram positivamente associadas, sendo que o aumento de 1 pg/mL de sTNFR1 aumenta 0,56 pontos no escore

composto cognitivo e 0,51 pontos no escore composto motor. Depois de ajustar para a idade e para o gênero, não foram identificadas diferenças nos valores de β and R^2 , demonstrando que esses fatores não foram considerados fatores de confusão nessa amostra avaliada.

Tabela 7. Análise de regressão linear múltipla *stepwise*.

Biomarcadores	Escore composto cognitivo			Escore composto motor		
	β	p	R^2	β	p	R^2
			0,37			0,24
Leptina (pg/mL)	-0,40	0,001*				
sTNFR1 (pg/mL)	0,56	0,0001*		0,51	0,003*	
sTNFR2 (pg/mL)	-0,14	0,40		0,11	0,66	
CAT ($\Delta E/min/mg$)				0,22	0,16	

β , coeficiente de regressão padronizado; R^2 , coeficiente de determinação ajustado.

6 DISCUSSÃO

6.1 Estudo 1

Esse estudo demonstrou que crianças com sobrepeso e obesidade entre seis e 24 meses de idade apresentaram maiores concentrações de leptina, adiponectina, BDNF e cortisol, bem como menores concentrações de TBARS e menor atividade das enzimas CAT e SOD, quando comparados aos pares eutróficos. Não foram encontradas diferenças nas concentrações de resistina, receptores solúveis de TNF, quimiocinas e na capacidade antioxidante total entre os grupos. É importante destacar que esse foi o primeiro estudo que avaliou todos esses biomarcadores em crianças nessa faixa etária e todos os resultados indicaram alterações nas respostas neuroendócrino-inflamatórias em crianças com sobrepeso/obesidade. Além disso, é possível evidenciar que as alterações nas secreções neuroendócrinas ocorrem na tentativa de controlar o desencadeamento do processo inflamatório nessa faixa etária.

O aumento das concentrações de leptina encontrado no presente estudo era esperado, uma vez que as crianças com sobrepeso/obesidade apresentaram aumento significativo do peso corporal e do IMC. O aumento da concentração de leptina está diretamente associado à quantidade de massa do tecido adiposo ou grau de obesidade (ANTUNA-PUENTE *et al.*, 2008; CRUJEIRAS *et al.*, 2015; LEONI *et al.*, 2010). A leptina é uma adipocina que envia informações para o hipotálamo a respeito dos estoques de gordura corporal, regulando a ingestão alimentar e o gasto energético a fim de manter a homeostase energética corporal (APRATH-HUSMANN *et al.*, 2001; LEONI *et al.*, 2010). Assim, o aumento das concentrações circulantes de leptina ocorre na tentativa de inibir o aumento dos depósitos de gordura, seja por meio da inibição da proliferação dos pré-adipócitos ou via redução do tamanho dos adipócitos (HARRIS, 2014). Porém, elevadas concentrações de leptina podem induzir a ativação de monócitos, a produção de citocinas e o desequilíbrio redox (FANTUZZI, 2005). No presente estudo, as concentrações de leptina foram positivamente associadas com as concentrações de sTNFR1 e negativamente associadas com as concentrações de adiponectina nas crianças do grupo sobrepeso/obeso, demonstrando que o aumento das concentrações plasmáticas de leptina pode criar um ambiente que predispõe à subsequente resposta inflamatória.

As concentrações plasmáticas de adiponectina também se apresentaram elevadas nas crianças do grupo sobrepeso/obeso, quando comparadas às crianças eutróficas. Porém, estes achados diferem dos resultados de outros estudos que encontraram reduzidas concentrações

de adiponectina circulantes em crianças obesas na idade escolar (ZOU *et al.*, 2007; YOSHINAGA *et al.*, 2008; ALIKAŞLIFOĞLU *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2016). É importante apontar que as concentrações de adiponectina não são relacionadas somente com a quantidade de gordura corporal, mas também com o estágio maturacional do tecido adiposo (MARTOS-MORENO *et al.*, 2010). As concentrações de adiponectina são elevadas ao nascimento, correlacionam positivamente com a adiposidade no período neonatal (KOTANI *et al.*, 2004) e reduzem longitudinalmente com o aumento da idade e da adiposidade na infância e vida adulta (JEFFERY *et al.*, 2008; STEFAN *et al.*, 2002). Cabe ressaltar que as maiores concentrações de adiponectina encontradas no grupo sobrepeso/obeso podem representar a tentativa do corpo humano de controlar o surgimento de doenças metabólicas e cardiovasculares relacionadas à obesidade nesta faixa etária, devido a seus efeitos anti-inflamatórios, anti-aterogênicos e anti-diabéticos (OHASHI *et al.*, 2010; OKAMOTO *et al.*, 2006; OKAMOTO *et al.*, 2008; GUERRE-MILO, 2004, FU *et al.*, 2005). No presente estudo, as concentrações plasmáticas de adiponectina do grupo sobrepeso/obeso foram inversamente associadas com biomarcadores pró-inflamatórios tais como leptina, sTNFR1 e IL-8. Este achado reforça o fato de que o aumento na concentração plasmática de adiponectina no grupo sobrepeso/obeso parece ter ocorrido na tentativa de conter a ocorrência de estado inflamatório crônico sublimiar nesta faixa etária.

Juntamente com a adiponectina, as concentrações de cortisol se encontraram elevadas no grupo sobrepeso/obeso, podendo contribuir também para a redução de respostas inflamatórias por meio da supressão de genes imune/inflamatórios (OHASHI *et al.*, 2010; DALMAS *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014). As concentrações séricas de cortisol apresentaram associação negativa com as concentrações plasmáticas de sTNFR1 e MCP-1 no grupo sobrepeso/obeso. O cortisol reduz a expressão de quimiocinas e o recrutamento de macrófagos, diminuindo o acúmulo de macrófagos no tecido adiposo (PATSOURIS *et al.*, 2009). Além disso, a adiponectina funciona com um regulador do fenótipo de macrófagos, favorecendo a mudança do estado pró-inflamatório M1 para o estado anti-inflamatório M2. Nesse último estado de ativação ocorre secreção de citocinas anti-inflamatórias e redução da expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, bem como redução da formação de espécies reativas de oxigênio (OHASHI *et al.*, 2010; FANTUZZI, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2006; OKAMOTO *et al.*, 2008; DALMAS *et al.*, 2011).

Dessa forma, as maiores concentrações plasmáticas de adiponectina e séricas de cortisol podem ter impedido o aumento das concentrações plasmáticas dos biomarcadores pró-inflamatórios sTNFR1, MCP-1 e IL-8 nas crianças com sobrepeso/obesidade. sTNFR1 é

conhecido como o principal mediador da função do TNF (CAWTHORN & SETHI, 2008) e da inflamação no tecido adiposo (SUGANAMI *et al.*, 2005; LACASA *et al.*, 2007). MCP-1 é considerada pivô no recrutamento de monócitos para o tecido adiposo e modificação do fenótipo de macrófagos para o estado pró-inflamatório M1 (XU *et al.*, 2015; PATSOURIS *et al.*, 2009) e IL-8 está envolvida no recrutamento de monócitos e outras células imunes para dentro do tecido adiposo (LACASA *et al.*, 2007; OKAMOTO *et al.*, 2008). No presente estudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos nas concentrações plasmáticas desses biomarcadores, bem como de outros biomarcadores com papel pró-inflamatório como resistina, sTNFR2, RANTES, IP-10 e MIG. Apesar da literatura apontar aumento das concentrações de biomarcadores pró-inflamatórios em crianças obesas na idade escolar (ECONOMOU *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006; SCHIPPER *et al.*, 2012; BRESLIN *et al.*, 2012; LANDGRAF *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2014b; ZHANG *et al.*, 2011), parece que o processo pró-inflamatório sublimar ainda não foi ativado em crianças com sobrepeso e obesidade nos dois primeiros anos de vida. Embora tenha sido demonstrado no presente estudo aumento das concentrações de leptina, uma adipocina com característica pró-inflamatória, esses achados parecem indicar que o aumento das concentrações de adiponectina e cortisol pode contribuir para inibir o desencadeamento do processo inflamatório.

As crianças do grupo sobrepeso/obeso ainda apresentaram maiores concentrações de BDNF. Juntamente com a leptina, o BDNF também está envolvido com as vias regulatórias hipotalâmicas relacionadas com o controle do peso corporal e da homeostase energética (WANG *et al.*, 2013; ROSAS-VARGAS *et al.*, 2011; ROTH *et al.*, 2013). Porém, as concentrações destes biomarcadores não foram associadas no presente estudo. Neste estudo, as concentrações plasmáticas de BDNF foram positivamente associadas com as concentrações plasmáticas de sTNFR1, MCP-1, IL-8 e IP-10. O BDNF está presente em altas concentrações na infância e é expresso durante o desenvolvimento e maturação do sistema nervoso central, bem como em muitos tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo (JIN *et al.*, 2015). Observa-se que o BDNF possui um papel essencial na modulação da neuroinflamação, uma vez que as altas concentrações de BDNF podem aumentar a resistência ao estresse oxidativo e metabólico e funcionar como um importante neuroprotetor (MAROSI & MATTSON, 2014; ROSAS-VARGAS *et al.*, 2011).

Além disso, as crianças do grupo sobrepeso/obeso apresentaram menores concentrações de TBARS e menor atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. A literatura aponta que a disfunção do adipócito resultante do excesso de gordura corporal aumenta a produção de EROS, o que danifica as membranas celulares por um processo

denominado peroxidação lipídica. Essa reação leva à formação de MDA, que é evidenciada pelo aumento da concentração de TBARS em crianças com sobrepeso/obesidade (MARSEGLIA *et al.*, 2014; PHAM-HUY *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2006). Porém, o resultado do biomarcador de peroxidação lipídica (TBARS) do presente estudo foi distinto de outros estudos de crianças com excesso de peso na idade escolar (ZHU *et al.*, 2006; OLIVER *et al.*, 2010), sendo que a causa para essa diferença não foi completamente compreendida. Em contrapartida, os resultados referentes à atividade das enzimas CAT e SOD foram similares aos outros estudos, que demonstraram reduzida defesa antioxidante em crianças com sobrepeso/obesidade (ZHU *et al.*, 2006; RUPÉREZ *et al.*, 2013). Como a atividade das enzimas antioxidantes é estímulo-dependente, a menor concentração de TBARS encontrada nessas crianças pode ter reduzido a atividade das mesmas. Essa associação foi demonstrada no presente estudo em ambos os grupos. Já a capacidade antioxidante total (FRAP), que compreende os antioxidantes endógenos e exógenos, não foi diferente entre os grupos. Dessa forma, pode-se observar que crianças com sobrepeso/obesidade parecem apresentar menor peroxidação lipídica e menor defesa antioxidante quando comparadas aos seus pares eutróficos. Essa questão instiga novos estudos a verificar as possíveis causas desses achados.

Considerando a biologia e o desenvolvimento do tecido adiposo, o aumento da secreção da adiponectina e do cortisol está associado à indução do processo de diferenciação e proliferação de pré-adipócitos (KÖRNER *et al.*, 2005; SIVIERO-MIACHON *et al.*, 2009; GUZZETTI *et al.*, 2014). Além disso, o BDNF também possui um importante papel como regulador no processo de diferenciação do adipócito humano (BERNHARD *et al.*, 2013). Dessa forma, as maiores concentrações de adiponectina, cortisol e BDNF encontradas nas crianças com sobrepeso/obesidade do presente estudo podem sugerir que a expansão do tecido adiposo nessa faixa etária esteja associada com um grande aumento do número de adipócitos. No início da infância, o tecido adiposo se expande rapidamente como resultado do aumento do tamanho e número de adipócitos, sendo composto principalmente de pequenos e novos adipócitos diferenciados (KÖRNER *et al.*, 2005). De acordo com Laudes (2011), inicialmente o excesso de energia é armazenado como triglicerídeos adicionais em adipócitos pré-existent, o que resulta no aumento do tamanho dessas células, processo conhecido como hipertrofia. Posteriormente, se o número de adipócitos existentes não é suficiente para armazenar mais triglicerídeos, novos adipócitos são gerados por adipogênese em um processo descrito como hiperplasia. Um estudo clássico mostrou que os depósitos de gordura de crianças eutróficas entre seis e 12 meses de idade aumentam primariamente pelo aumento do tamanho do adipócito, com pouca contribuição do aumento do número dessas células. Já entre

12 e 24 meses de idade, ocorre redução do tamanho, com consequente aumento do número dos adipócitos, demonstrando que esse período é marcado por importante hipercelularidade do tecido adiposo (KNITTLE *et al.*, 1979). Porém, é importante apontar que não foram encontrados estudos sobre a expansão do tecido adiposo em crianças com excesso de peso até os 24 meses de idade, permanecendo uma lacuna na literatura a respeito dessa questão. Embora esse estudo não tenha avaliado amostras de tecido adiposo que possam confirmar a possível expansão deste tecido nas crianças com sobrepeso/obesidade, os resultados sugerem que o mesmo parece ter ocorrido por meio do equilíbrio entre a hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo, mas com marcada hipercelularidade do tecido adiposo.

A precoce hipercelularidade em crianças obesas é considerada a maior preditora da massa adiposa no futuro (LANDGRAF *et al.*, 2015). Essa questão chama atenção para o modelo “hiperplásico” de obesidade em crianças, que difere do modelo “hipertrófico” da obesidade em adultos (MARTOS-MORENO *et al.*, 2013). No modelo “hiperplásico” ocorre expansão saudável do tecido adiposo, com presença de pequenos adipócitos diferenciados e macrófagos do tipo M2, que ajudam a manter a homeostase do tecido e preservar a funcionalidade celular (SUN *et al.*, 2011; DALMAS *et al.*, 2011; SORISKY *et al.*, 2013). Em contrapartida, no modelo “hipertrófico”, a expansão patológica do tecido adiposo consiste no alargamento excessivo de adipócitos pré-existent e predomínio de macrófagos do tipo M1, o que leva ao fenótipo pró-inflamatório (SUN *et al.*, 2011).

Além disso, a dinâmica da secreção das adipocinas, cortisol e BDNF é diferente durante as distintas fases de crescimento e desenvolvimento no início da infância, idade escolar, adolescência e vida adulta (MARTOS-MORENO *et al.*, 2013; ROTH *et al.*, 2013). Dessa forma, é importante apontar que apesar do aumento precoce das concentrações de cortisol e adiponectina proteger parcialmente contra o processo inflamatório crônico sublimar no início da infância, em longo prazo pode predispor a outras complicações metabólicas. Elevadas concentrações de leptina em longo prazo promovem resistência à insulina e desregulação do balanço energético, o que reduz seus efeitos benéficos e modifica sua função para um perfil pró-inflamatório e indutor de desequilíbrio redox (CRUJEIRAS *et al.*, 2015; SAVINO *et al.*, 2009; FANTUZZI, 2005; GUERRE-MILLO, 2004). O excesso crônico de cortisol promove aumento da gordura corporal e redistribuição dos adipócitos da periferia para depósitos centrais, com acúmulo de gordura visceral e obesidade abdominal (SIVIERO-MIACHON *et al.*, 2009; PATSOURIS *et al.*, 2009; GUZZETTI *et al.*, 2014; PAREDES & RIBEIRO, 2014; LEE *et al.*, 2014), que predispõe a fatores de risco cardiovasculares, resistência à insulina e desenvolvimento de síndrome metabólica em crianças e adolescentes

obesos (ADAM *et al.*, 2010; PRODAM *et al.*, 2013; GUZZETTI *et al.*, 2014; VELDHORST *et al.*, 2014). Elevação crônica das concentrações de cortisol e resistência à leptina podem ainda explicar a redução da secreção do BDNF encontrada em crianças morbidamente obesas e com síndrome metabólica (ROTH *et al.*, 2013; ARAKI *et al.*, 2014) e estão associados com déficits na cognição e na plasticidade sináptica (WOSISKI-KUHN *et al.*, 2014). Considerando que a adiponectina reduz longitudinalmente durante a infância (LI *et al.*, 2016) e baixas concentrações de adiponectina são preditivas para fatores de risco cardiovasculares e síndrome metabólica em crianças obesas na idade escolar (YOSHINAGA *et al.*, 2008; KÖRNER *et al.*, 2007), seu papel protetor também estaria reduzido em longo prazo. Dessa forma, é possível que as alterações neuroendócrinas precoces encontradas nesse estudo possam contribuir para o processo inflamatório crônico sublimiar e desequilíbrio redox de crianças com excesso de peso na idade escolar, adolescência e vida adulta.

É importante destacar que alguns fatores que poderiam ter interferido nos resultados foram controlados no presente estudo pelo pareamento entre os grupos. A amamentação é um dos fatores que precisam ser considerados, uma vez que adipocinas, cortisol e antioxidantes podem ser encontrados no leite materno (ÇATLI *et al.*, 2014; ZARBAN *et al.*, 2015). O uso de suplementos vitamínicos, prescritos pelos pediatras às crianças, também podem influenciar a capacidade antioxidante total (PHAM-HUY *et al.*, 2008). Além disso, o nível socioeconômico também pode afetar as concentrações de cortisol (PRODAM *et al.*, 2013).

Por fim, cabe ressaltar que este estudo apresenta algumas limitações. Primeiramente, o IMC foi utilizado para classificar os grupos e a realização de uma avaliação mais detalhada da composição corporal deve ser considerada em futuros estudos. Em segundo lugar, não foi possível controlar o perfil alimentar das crianças e certos fatores nutricionais podem modificar a secreção das adipocinas (ROMACHO *et al.*, 2015) e a capacidade antioxidante total (PHAM-HUY *et al.*, 2008). Por fim, foi conduzido um estudo transversal, sendo importante realizar estudos longitudinais para esclarecer o período em que outras alterações inflamatórias são ativadas.

6.2 Estudo 2

Esse foi o primeiro estudo que avaliou o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças com sobrepeso/obesidade quando comparadas aos pares eutróficos nos dois primeiros anos de vida. Neste estudo foi demonstrado que crianças com sobrepeso/obesidade

entre seis e 24 meses de idade apresentaram menores escores no teste de desenvolvimento cognitivo e motor, sendo o tamanho de efeito e o poder da diferença considerado moderado.

Em relação à cognição, a maior parte dos estudos não avaliou a diferença entre os grupos, mas demonstrou que existe uma relação inversa entre IMC e desenvolvimento cognitivo (DATAR & STURM, 2006; REINERT *et al.*, 2013). No presente estudo, apesar de ter sido encontrada diferença significativa entre os grupos, não foi demonstrada associação significativa entre o IMC e o desenvolvimento cognitivo. De acordo com Veldwijk *et al.* (2011) a associação entre IMC e cognição só é identificada quando não são controladas as variáveis de confusão como o condicionamento físico da criança e a escolaridade materna. Mães com maiores níveis de escolaridade podem propiciar um ambiente de aprendizado em casa que promove o desenvolvimento cognitivo infantil (GIBBS & FORSTE, 2014). Amamentação também promove efeitos benéficos no desenvolvimento da memória e linguagem nos primeiros dois anos de vida (CAI *et al.*, 2015). É importante considerar que, no presente estudo, os grupos foram pareados em relação à escolaridade da mãe, ao nível socioeconômico e ao período de amamentação exclusiva. Esse controle interno do estudo possibilitou inferir que a diferença encontrada entre os grupos parece ter sido devido ao excesso de peso da criança.

Além disso, foi encontrada associação negativa fraca do peso corporal e do comprimento corporal com o desenvolvimento cognitivo. Outros estudos demonstraram que indicadores antropométricos são significativamente associados com o desempenho cognitivo (HEINONEN *et al.*, 2008; SANDJAJA *et al.*, 2013). Esses autores encontraram associação negativa entre o peso corporal e o IMC com a cognição, bem como associação positiva entre estatura e cognição. É importante considerar que a maior parte dos estudos avaliou as habilidades cognitivas por meio de teste de quociente de inteligência (QI). Considerando que desenvolvimento cognitivo não é o mesmo que QI, esse achado pode ser considerado um artefato inerente ao tamanho da amostra estudada.

Já em relação ao desenvolvimento motor, o presente estudo avaliou o escore motor composto, que compreende o desenvolvimento motor grosso e fino. Estudos demonstram que crianças com excesso de peso apresentam pior desempenho nas habilidades motoras grossas e finas (MOND *et al.*, 2007; D'HONDT *et al.*, 2008; SLINING *et al.*, 2010; NERVIK *et al.*, 2011; CASTETBON & ANDREYEVA, 2012; CHIVERS *et al.*, 2013; D'HONDT *et al.*, 2013; GENTIER *et al.*, 2013b). Este estudo também identificou associação negativa fraca entre o IMC e o desenvolvimento motor. Morgen *et al.* (2014) também encontraram associação mínima significativa entre desenvolvimento motor e o peso, sugerindo que peso e

marcos motores são independentes. Porém, de acordo com o estudo de Castetbon e Andreyeva (2012), a associação entre as habilidades motoras grossas e o IMC depende do tipo de habilidade avaliada, sendo ainda observadas diferenças em relação ao gênero e à faixa etária estudada. Esses autores observaram que somente as habilidades motoras grossas que requerem alto gasto energético, como pular ou saltar, foram inversamente associadas com a obesidade, sendo que a maior parte das habilidades motoras não foi comprometida nas crianças com sobrepeso e obesidade entre quatro e seis anos de idade. No presente estudo, as habilidades motoras grossas, avaliadas pelo teste Bayley-III, referiam-se aos marcos motores e dependiam da faixa etária da criança. Dessa forma, crianças mais jovens realizaram tarefas diferentes de crianças mais velhas e não foi possível determinar se uma habilidade específica foi comprometida pelo excesso de peso.

A redução do desempenho motor de crianças com sobrepeso/obesidade é normalmente relacionada com questões biomecânicas e restrições morfológicas em tarefas que envolvem modificações do centro de massa (CHIVERS *et al.*, 2013). Porém, para Gentier *et al.* (2013a), a incompetência motora de crianças obesas deve ser observada de uma perspectiva mais ampla, além da explicação biomecânica. Esses autores demonstraram que crianças obesas são mais lentas em tarefas motoras, indicando problemas na função executiva e no planejamento de decisões e controle do movimento quando comparados aos seus pares eutróficos. Assim, acredita-se que a obesidade infantil também está associada com o comprometimento da função perceptual-motora e do desenvolvimento motor fino. D'Hondt *et al.* (2008) demonstraram que crianças obesas na idade escolar apresentaram maior dificuldade em realizar tarefas motoras finas quando comparadas às crianças eutróficas, mesmo em situações que não requeriam controle postural. De acordo com Chivers *et al.* (2013) o pior desempenho nas habilidades de manipulação de crianças com excesso de peso pode estar relacionado às questões morfológicas como o excesso de tecido adiposo dos dedos, que limitam a acurácia e a velocidade de realização da tarefa. Cabe ressaltar que, no presente estudo, as crianças realizavam os itens da escala motora fina na posição sentada no colo da mãe e, dessa forma, as mães podiam apoiar o tronco da criança a fim de impedir que o déficit de controle postural pudesse interferir na tarefa realizada.

Todos os estudos mencionados acima avaliaram crianças com idades superiores às do presente estudo, o que dificulta a comparação dos resultados encontrados. Somente o estudo de Slining *et al.* (2010) avaliou o desenvolvimento motor em idade semelhante, por meio da escala de desenvolvimento BSID-II, que corresponde à 2ª versão do teste Bayley, mas não avaliou o desenvolvimento cognitivo. Nesse estudo longitudinal foram controladas as

variáveis de confusão com gênero, idade, idade da mãe, peso e nível de escolaridade, sendo verificada relação negativa entre IMC e desenvolvimento motor em crianças com baixo nível socioeconômico. Considerando que a variabilidade é uma característica peculiar do desenvolvimento motor, que pode ser influenciado por vários fatores como nível socioeconômico (TAANILA *et al.*, 2005; GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007), gênero (MOND *et al.*, 2007; CASTETBON & ANDREYEVA, 2012) e idade (CHIVERS *et al.*, 2013), a maior parte da amostra do presente estudo foi representada por crianças com nível socioeconômico médio (classe C), de acordo com a CCEB-ABEP, o que minimizou a influência desse fator no desenvolvimento motor.

Os instrumentos de avaliação cognitiva e motora também foram distintos entre os diferentes estudos e avaliaram, muitas vezes, constructos diferentes. As habilidades cognitivas foram avaliadas em alguns estudos por meio de testes de QI e de função executiva na infância. As habilidades motoras grossas e finas também foram avaliadas com testes diferentes e, dessa forma, as comparações devem ser generalizadas com cautela. No presente estudo foi utilizado o teste Bayley-III, considerado padrão-ouro para avaliação do desenvolvimento infantil. Entretanto, é oportuno mencionar que o teste Bayley-III é um instrumento utilizado principalmente para avaliação e identificação de crianças com desordens cognitivas e motoras notoriamente identificadas (BAYLEY, 2006), o que pode indicar limitada capacidade para detectar alterações sutis do desenvolvimento cognitivo e motor. Assim, apesar das crianças com sobrepeso/obesidade terem apresentado pior desempenho no teste Bayley-III, a maior parte demonstrou escores compostos dentro dos valores médios esperados pelo teste, o que indica desenvolvimento cognitivo e motor dentro dos limites da normalidade.

Por fim, cabe salientar que a amostra do grupo excesso de peso foi constituída de crianças com sobrepeso e obesidade. Essa questão pode ter aumentado a variabilidade do desenvolvimento cognitivo e motor e ter reduzido o poder e o tamanho do efeito. Assim, acredita-se que as diferenças encontradas entre os grupos poderiam ser maiores caso o grupo possuísse apenas crianças obesas. Além disso, sabe-se que crianças com sobrepeso e obesidade não possuem importante comprometimento cognitivo e motor como crianças com incapacidades, o que pode explicar o poder e tamanho do efeito moderados. Porém, mesmo comprometimentos sutis nessa faixa etária podem ter impacto negativo na idade escolar. Outros estudos sugerem que crianças que apresentam alterações cognitivas e motoras sutis no início da infância irão apresentar importantes dificuldades motoras, cognitivas, comportamentais e de aprendizado na idade escolar (GOYEN & LUI, 2009).

Apesar de apresentar algumas limitações, esse foi o primeiro estudo que apresentou um rigoroso controle na tentativa de minimizar os fatores de confusão. Foram avaliadas crianças com uma ampla faixa etária (seis a 24 meses), mas para cada criança do grupo sobrepeso/obeso foi incluída uma criança eutrófica pareada pelo gênero, idade, nível socioeconômico, escolaridade materna e período de amamentação exclusiva. É importante ainda considerar que o escore composto do teste Bayley-III possibilitou avaliar e comparar todas as crianças, independente da faixa etária. Dessa forma, o controle interno do estudo permitiu demonstrar que as crianças do grupo sobrepeso/obeso apresentaram pior desempenho cognitivo e motor quando comparadas às crianças eutróficas na mesma faixa etária.

6.3 Estudo 3

Os resultados deste estudo demonstraram que dois biomarcadores relacionados à obesidade estão associados com o desenvolvimento infantil entre seis e 24 meses de idade. O biomarcador sTNFR1 foi diretamente associado com o desenvolvimento cognitivo e motor e o biomarcador leptina foi inversamente associado com o desenvolvimento cognitivo. É importante destacar que este foi o primeiro estudo que avaliou a relação entre os biomarcadores relacionados à obesidade com o desenvolvimento cognitivo e motor nessa faixa etária.

No presente estudo, o aumento das concentrações plasmáticas de sTNFR1 foi considerado o principal preditor do aumento dos escores de desenvolvimento cognitivo e motor. Estudos apontam que as concentrações de TNF podem apresentar efeitos deletérios ou protetores em neurônios, podendo contribuir tanto para degeneração precoce quanto para recuperação neuronal (LUCAS *et al.*, 2006; GARCIA-BUENO *et al.*, 2008; LEONARDO *et al.*, 2009). Dessa forma, baixas concentrações de biomarcadores pró-inflamatórios podem ser indutores de fatores de crescimento e permitir sobrevida celular, enquanto moderadas ou altas concentrações promovem efeitos supressores ou excessivamente proliferativos na neurogênese (WHITNEY *et al.*, 2009). No estudo de Terrado *et al.* (2000), o aumento da expressão de sTNFR1 na circulação foi associado com o aumento do número de motoneurônios sobreviventes no sistema nervoso central (SNC) de camundongos durante o período pós-natal. Foi então demonstrado que a neutralização do TNF por seu receptor circulante sTNFR1 pode diminuir a ocorrência de morte celular em motoneurônios lesionados (TERRADO *et al.*, 2000). Em contrapartida, o aumento excessivo da concentração de

biomarcadores pró-inflamatórios como TNF pode promover neuroinflamação, desencadeando efeito prejudicial na neurogênese e no desenvolvimento cerebral (CALABRESE *et al.*, 2014).

Dessa forma, as concentrações de sTNFR1 podem proteger neurônios ou promover dano cerebral, refletindo a complexidade das ações do TNF no SNC (TERRADO *et al.*, 2000). É importante mencionar que no primeiro estudo desenvolvido por nosso grupo as concentrações plasmáticas de sTNFR1 não apresentaram diferença significativa entre as crianças do grupo sobrepeso/obeso e as crianças do grupo eutrófico, não sendo evidenciado desencadeamento de processo inflamatório sublimiar em crianças com sobrepeso/obesidade. Assim, o aumento das concentrações de sTNFR1 parece potencializar o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças entre seis e 24 meses de idade, mas sem estar relacionado aos aspectos de excesso de peso.

Outro importante achado do presente estudo refere-se ao fato do aumento das concentrações plasmáticas de leptina estar associado à redução dos escores de desenvolvimento cognitivo. Os receptores de leptina estão localizados em áreas corticais hipotalâmicas e extra-hipotalâmicas (FARR *et al.*, 2015), sendo que dentre as ações centrais da leptina estão a regulação da homeostase energética corporal e a influência em processos cognitivos (STIEG *et al.*, 2015). A leptina é um importante sinalizador hormonal durante o desenvolvimento do SNC, sendo considerada essencial para o crescimento, desenvolvimento e maturação cerebral (PAZ-FILHO *et al.*, 2008; FARR *et al.*, 2015). De acordo com Udagawa *et al.* (2007), a leptina é necessária durante os períodos de desenvolvimento fetal e neonatal para completo desenvolvimento das estruturas e funções cerebrais. A leptina também possui ação central no hipocampo, desempenhando um papel importante nos processos de aprendizado e memória (STIEG *et al.*, 2015; FARR *et al.*, 2006). Porém, na obesidade são encontradas elevações crônicas de leptina, bem como limitada função cognitiva (MILLER *et al.*, 2013). Dessa forma, as concentrações de leptina podem comprometer a memória quando existe resistência à leptina no cérebro (FARR *et al.*, 2006).

No primeiro estudo do nosso grupo foi demonstrado que crianças com sobrepeso/obesidade entre seis e 24 meses de idade apresentaram maiores concentrações de leptina quando comparadas com os pares eutróficos, o que poderia predispor à resistência à leptina e explicar a redução dos escores compostos cognitivos. Além disso, o aumento das concentrações plasmáticas de leptina pode criar um ambiente que propicia à subsequente resposta pró-inflamatória. Assim, a desregulação da secreção de adipocinas com papel pró-inflamatório pode comprometer a neurogênese e promover neuroinflamação no microambiente de desenvolvimento de células-tronco neurais (CALABRESE *et al.*, 2014).

Quando a obesidade ocorre no início da infância, período de intenso desenvolvimento cerebral, as crianças podem ser expostas aos efeitos biológicos relacionados à obesidade. Nesta faixa etária, as conexões cérebro-comportamentais estão sendo estabelecidas e podem interferir nos desfechos de desenvolvimento em longo prazo (MILLER *et al.*, 2015). No estudo de Jiang *et al.* (2014) foi demonstrado que as concentrações de biomarcadores relacionados com a inflamação pode prever desfechos de desenvolvimento, sendo que elevadas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 foram associadas com menores escores de neurodesenvolvimento no primeiro ano de vida.

Porém, outros biomarcadores relacionados à obesidade não foram associados ou não puderam prever o desenvolvimento cognitivo e motor de crianças nos primeiros anos de vida. Embora no primeiro estudo do nosso grupo tenham sido encontradas maiores concentrações séricas de cortisol e maiores concentrações plasmáticas de BDNF e adiponectina em crianças com sobrepeso/obesidade quando comparadas aos pares eutróficos, estas diferenças não foram relacionadas com o desenvolvimento cognitivo e motor no presente estudo. Outros estudos tem demonstrado que esses biomarcadores estão associados com desfechos de desenvolvimento nos primeiros anos de vida. No estudo de Forns *et al.* (2014), elevadas concentrações de cortisol foram positivamente associadas com o desenvolvimento cognitivo de crianças durante o segundo ano de vida. Em contrapartida, elevadas concentrações de cortisol podem prever menor função executiva e menores desfechos acadêmicos em crianças com 36 meses de idade (BERRY *et al.*, 2012). As concentrações de BDNF também foram negativamente associadas com o desenvolvimento cognitivo na idade pré-escolar, sugerindo que a desregulação do BDNF pode estar relacionada com o comprometimento intelectual (YEOM *et al.*, 2016). Além disso, elevadas concentrações plasmáticas de adiponectina foram associadas com degeneração e declínio cognitivo em adultos (WENNBERG *et al.*, 2016).

A literatura também aponta que a obesidade infantil está associada com a desregulação de adipocinas pró-inflamatórias e desequilíbrio redox, os quais podem acometer negativamente o desenvolvimento cerebral e promover o desenvolvimento de patologias neurodegenerativas cerebrais (MILLER *et al.*, 2015; CALABRESE *et al.*, 2014; BILBO *et al.*, 2012; WHITNEY *et al.*, 2009). Porém, os resultados do nosso primeiro estudo demonstraram que as crianças do grupo sobrepeso/obeso ainda não apresentaram ativação do processo inflamatório sublimiar, uma vez que não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de resistina, sTNFR1, sTNFR2, MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 e MIG. Além disso, as crianças com sobrepeso/obesidade apresentaram menor concentração

de TBARS e menor atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD, entretanto, pouco é conhecido a respeito do desequilíbrio redox e desenvolvimento infantil.

É importante mencionar que algumas associações podem ser desenvolvidas ou modificadas ao longo do tempo, uma vez nessa faixa etária o sobrepeso ou a obesidade infantil podem não ter sido firmemente estabelecidos. No presente estudo, o objetivo foi verificar se biomarcadores relacionados à obesidade estão associados ou podem predizer desfechos do desenvolvimento em crianças nos dois primeiros anos de vida. Apesar da fisiologia não ser determinística, é importante observar que pode apresentar um papel importante nos desfechos do desenvolvimento (MILLER *et al.*, 2013). Assim, os achados do presente estudo revelaram que as concentrações plasmáticas de leptina e sTNFR1 explicam juntos 37% da variabilidade dos escores compostos cognitivos e as concentrações plasmáticas de sTNFR1 explicam 24% da variabilidade dos escores compostos motores. Cabe ressaltar que, como o desenvolvimento infantil é multifatorial, além de ser influenciado pela biologia, o ambiente em que a criança está inserida também possui importante influência (NEELON *et al.*, 2012).

7 CONCLUSÕES

Todos os resultados analisados em conjunto apontam a presença de alterações neuroendócrino-inflamatórias em crianças com sobrepeso/obesidade entre seis e 24 meses de idade. Embora já exista um ambiente que predisponha a uma subsequente resposta pró-inflamatória, foi possível sugerir que as alterações nas secreções neuroendócrinas ocorrem na tentativa de controlar o desencadeamento do processo inflamatório nessa faixa etária. Além disso, embora a maior parte das crianças com sobrepeso/obesidade apresentem desenvolvimento infantil dentro dos limites de normalidade, evidencia-se pior desempenho cognitivo e motor.

Foi ainda demonstrado que elevadas concentrações de sTNFR1 e reduzidas concentrações de leptina foram associadas com melhores desfechos de desenvolvimento infantil nessa faixa etária. Dessa forma, as concentrações plasmáticas de sTNFR1 puderam prever os escores de desenvolvimento cognitivo e motor por um mecanismo que não parece estar ligado ao excesso de peso. Já o aumento das concentrações plasmáticas de leptina está associado ao menor desenvolvimento cognitivo nessa faixa etária e parece estar relacionado à criação de um ambiente que predispõe à subsequente resposta pró-inflamatória.

8 REFERÊNCIAS

- ADAM, T. C. et al. Cortisol is negatively associated with insulin sensitivity in overweight Latino youth. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 10, p. 4729-4735, 2010.
- ADAMSKA, A. et al. Relationships between serum adiponectin and soluble TNF- α receptors and glucose and lipid oxidation in lean and obese subjects. **Acta diabetologica**, v. 49, n. 1, p. 17-24, 2012.
- ALBUALI, W. H. Evaluation of oxidant-antioxidant status in overweight and morbidly obese Saudi children. **World journal of clinical pediatrics**, v. 3, n. 1, p. 6-13, 2014.
- ALIKAŞLIFOĞLU, A. et al. The relationship between serum adiponectin, tumor necrosis factor-alpha, leptin levels and insulin sensitivity in childhood and adolescent obesity: adiponectin is a marker of metabolic syndrome. **Journal of clinical research in pediatric endocrinology**, v. 1, n. 5, p.233-239, 2009.
- ANTUNA-PUENTE, B. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes & metabolism**, v. 34, n. 1, p. 2-11, 2008.
- APRATH-HUSMANN, I. et al. Effects of leptin on the differentiation and metabolism of human adipocytes. **International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders**, v. 25, n. 10, p.1465-1470, 2001.
- ARAKI, S. et al. Decreased plasma levels of brain-derived neurotrophic factor and its relationship with obesity and birth weight in obese Japanese children. **Obesity research & clinical practice**, v. 8, n. 1, p. e63-e69, 2014.
- ARAYA, A. V.; ORELLANA, X.; ESPINOZA, J. Evaluation of the effect of caloric restriction on serum BDNF in overweight and obese subjects: preliminary evidences. **Endocrine**, v. 33, n. 3, p. 300-304, 2008.
- ARMANI, A. et al. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. **Journal of cellular biochemistry**, v. 110, n. 3, p. 564-572, 2010.
- ARNER, E. et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 105-109, 2010.
- ASHWORTH, A.; SHRIMPTON, R.; JAMIL, K. Growth monitoring and promotion: review of evidence of impact. **Maternal & child nutrition**, v. 4, n. s1, p. 86-117, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA. **Critério de classificação econômica Brasil**. Abep São Paulo, 2008.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 565-568, 1998.

BAIDAL, J. A. W. et al. Risk Factors for Childhood Obesity in the First 1,000 Days: A Systematic Review. **American journal of preventive medicine**, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26916261>>. Acesso em: 29 de fev 2016.

BAIRD, J. et al. Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. **BMJ**, v. 331, n. 7522, p. 929, 2005.

BARKIN, S.; RAO, Y.; SMITH, P. A novel approach to the study of pediatric obesity: a biomarker model. **Pediatric annals**, v. 41, n. 6, p. 250-256, 2012.

BAYLEY, N. **Bayley scales of infant and toddler development**. 3ª ed. San Antonio, Texas: Harcourt Assessment, 2006.

BELSKY, D. W. et al. Is obesity associated with a decline in intelligence quotient during the first half of the life course? **American journal of epidemiology**, v. 178, n. 9, p. 1461-1468, 2013.

BEMELMANS, M.; VAN TITS, L.; BUURMAN, W. Tumor necrosis factor: function, release and clearance. **Critical Reviews in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 1996.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERNHARD, F. et al. Functional relevance of genes implicated by obesity genome-wide association study signals for human adipocyte biology. **Diabetologia**, v. 56, n. 2, p. 311-322, 2013.

BERRY, D. et al. Salivary alpha-amylase and cortisol in infancy and toddlerhood: Direct and indirect relations with executive functioning and academic ability in childhood. **Psychoneuroendocrinology**, v. 37, n. 10, p. 1700-1711, 2012.

BLAIR, C.; GRANGER, D.; PETERS RAZZA, R. Cortisol reactivity is positively related to executive function in preschool children attending Head Start. **Child development**, v. 76, n. 3, p. 554-567, 2005.

BLAIR, C. et al. Salivary cortisol mediates effects of poverty and parenting on executive functions in early childhood. **Child development**, v. 82, n. 6, p. 1970-1984, 2011.

BLAKE-LAMB, T. L. et al. Interventions for Childhood Obesity in the First 1,000 Days A Systematic Review. **American journal of preventive medicine**, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26916260>>. Acesso em: 29 de fev 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRESLIN, W. L. et al. Obese Mexican American children have elevated MCP-1, TNF- α , monocyte concentration, and dyslipidemia. **Pediatrics**, v. 129, n. 5, p. e1180-e1186, 2012.

BROWN, L. A. et al. Oxidant Stress in Healthy Normal-weight, Overweight, and Obese Individuals. **Obesity**, v. 17, n. 3, p. 460-466, 2009.

BRUUN, J. M. et al. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 3, p. e527-e533, 2003.

BULLÓ, M.; GARCIA-LORDA, P.; SALAS-SALVADÓ, J. Plasma soluble tumor necrosis factor alpha receptors and leptin levels in normal-weight and obese women: effect of adiposity and diabetes. **European Journal of Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 325-331, 2002.

CAI, S. et al. Infant feeding effects on early neurocognitive development in Asian children. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, n. 2, p. 326-36, 2015.

CALABRESE, F. et al. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 430-453, 2014.

CANADIAN PAEDIATRIC SOCIETY. A health professional's guide for using the new WHO growth charts. **Paediatrics & Child Health**, v. 15, n. 2, p. 84-98, 2010.

CANAS, J. A.; SWEETEN, S.; BALAGOPAL, P. B. Biomarkers for cardiovascular risk in children. **Current opinion in cardiology**, v. 28, n. 2, p. 103-114, 2013.

CARMONA-MONTESINOS, E. et al. Changes in C-reactive protein and biochemical profile in preschool children with obesity. **Nutricion hospitalaria**, v. 32, n. 4, p. 1548-1553, 2015.

CASTETBON, K.; ANDREYEVA, T. Obesity and motor skills among 4 to 6-year-old children in the United States: nationally-representative surveys. **BMC Pediatrics**, v. 12, p. 28, p. 1-20, 2012.

ÇATLI, G.; DÜNDAR, N. O.; DÜNDAR, B. N. Adipokines in breast milk: an update. **Journal of clinical research in pediatric endocrinology**, v. 6, n. 4, p. 192-201, 2014.

CAWTHORN, W. P.; SCHELLER, E. L.; MACDOUGALD, O. A. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. **Journal of lipid research**, v. 53, n. 2, p. 227-246, 2012.

CAWTHORN, W. P.; SETHI, J. K. TNF- α and adipocyte biology. **FEBS letters**, v. 582, n. 1, p. 117-131, 2008.

CHAO, M. V.; RAJAGOPAL, R.; LEE, F. S. Neurotrophin signalling in health and disease. **Clinical Science**, v. 110, n. 2, p. 167-173, 2006.

CHEN, X.-Y. et al. Association of serum resistin levels with metabolic syndrome and early atherosclerosis in obese Chinese children. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 9-10, p. 855-860, 2013.

CHIVERS, P. et al. Low motor performance scores among overweight children: Poor coordination or morphological constraints? **Human movement science**, v. 32, n. 5, p. 1127-1137, 2013.

COCETTI, M. et al. Prevalence and factors associated with overweight among Brazilian children younger than 2 years. **Jornal de pediatria**, v. 88, n. 6, p. 503-508, 2012.

CODOÑER-FRANCH, P. et al. Plasma resistin levels are associated with homocysteine, endothelial activation, and nitrosative stress in obese youths. **Clinical biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 44-48, 2014.

CRUJEIRAS, A. B. et al. Leptin resistance in obesity: an epigenetic landscape. **Life sciences**, v. 140, p. 57-63, 2015.

D'HONDT, E. et al. Childhood obesity affects fine motor skill performance under different postural constraints. **Neuroscience Letters**, v. 440, n. 1, p. 72-5, 2008.

D'HONDT, E. et al. A longitudinal analysis of gross motor coordination in overweight and obese children versus normal-weight peers. **International journal of obesity**, v. 37, n. 1, p. 61-67, 2013.

D'HONDT, E. et al. Relationship between motor skill and body mass index in 5-to 10-year-old children. **Adapted Physical Activity Quarterly**, v. 26, n. 1, p. 21-37, 2009.

DADO, JOÃO. Câmara dos Deputados. **Projeto de Lei (PL6522/2009)**. Cria o Programa de Prevenção, Orientação e Tratamento da Obesidade Infantil. Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=462561>>. Acesso em: 26 de fev 2016.

DALMAS, E.; CLÉMENT, K.; GUERRE-MILLO, M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. **Trends in immunology**, v. 32, n. 7, p. 307-314, 2011.

DANIELS, S. R. et al. American Heart Association Childhood Obesity Research Summit Executive Summary. **Circulation**, v. 119, n. 15, p. 2114-2123, 2009.

DATAR, A.; STURM, R. Childhood overweight and elementary school outcomes. **International journal of obesity**, v. 30, n. 9, p. 1449-1460, 2006.

DE CUNTO, A. et al. Can body mass index accurately predict adiposity in newborns? **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 99, n. 3, p.238-239, 2014.

DE HOOG, M. L. et al. Overweight at age two years in a multi-ethnic cohort (ABCD study): the role of prenatal factors, birth outcomes and postnatal factors. **BMC Public Health**, v. 11, n. 1, p. 611-630, 2011.

DE ONIS, M.; LOBSTEIN, T. Defining obesity risk status in the general childhood population: which cut-offs should we use? **International Journal of Pediatric Obesity**, v. 5, n. 6, p. 458-460, 2010.

DEVASAGAYAM, T. et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 794-804, 2004.

DRUET, C. et al. Prediction of childhood obesity by infancy weight gain: an individual-level meta-analysis. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 19-26, 2012.

DUBOIS, L.; GIRARD, M. Early determinants of overweight at 4.5 years in a population-based longitudinal study. **International journal of obesity**, v. 30, n. 4, p. 610-617, 2006.

DZIENIS-STRACZKOWSKA, S. et al. Soluble tumor necrosis factor- α receptors in young obese subjects with normal and impaired glucose tolerance. **Diabetes Care**, v. 26, n. 3, p. 875-880, 2003.

ECONOMOU, E. V. et al. Negative association between circulating total homocysteine and proinflammatory chemokines MCP-1 and RANTES in prepubertal lean, but not in obese, children. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 310-315, 2004.

EL-GHARBAWY, A. H. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in lean and overweight children and adolescents. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 9, p. 3548-3552, 2006.

ERIKSSON, M.; TYNELIUS, P.; RASMUSSEN, F. Associations of birthweight and infant growth with body composition at age 15—the COMPASS study. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 22, n. 4, p. 379-388, 2008.

EUSER, A. M. et al. Associations between prenatal and infancy weight gain and BMI, fat mass, and fat distribution in young adulthood: a prospective cohort study in males and females born very preterm. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 2, p. 480-487, 2005.

FAIENZA, M. F. et al. Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 78, n. 3, p. 158-164, 2012.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911-919, 2005.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell metabolism**, v. 4, n. 4, p. 263-273, 2006.

FARR, O. M. Leptin and the brain: influences on brain development, cognitive functioning and psychiatric disorders. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 114-130, 2015.

FARR, S. A. Effects of leptin on memory processing. **Peptides**, v. 27, n. 6, p. 1420-1425, 2006.

FERNANDEZ-REAL, J.-M. et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. **Diabetes**, v. 47, n. 11, p. 1757-1762, 1998.

FERNANDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FÈVE, B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 4, p. 483-499, 2005.

FORNS, J. et al. Association between Child Cortisol Levels in Saliva and Neuropsychological Development during the Second Year of Life. **Stress and Health**, v. 30, n. 2, p. 142-148, 2014.

FRANCIS, L.; GRANGER, D.; SUSMAN, E. Adrenocortical regulation, eating in the absence of hunger and BMI in young children. **Appetite**, v. 64, p. 32-38, 2013.

FRIED, S. K. et al. Regulation of leptin production in humans. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 12, p. 3127S-3131S, 2000.

FU, Y. et al. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 7, p. 1369-1379, 2005.

FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

GALINIER, A. et al. Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 18, p. 12682-12687, 2006.

GARCÍA-BUENO, B.; CASO, J. R.; LEZA, J. C. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 6, p. 1136-1151, 2008.

GATHERCOLE, L. L. et al. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26223-e26244, 2011.

GENTIER, I. et al. A comparative study of performance in simple and choice reaction time tasks between obese and healthy-weight children. **Research in developmental disabilities**, v. 34, n. 9, p. 2635-2641, 2013a.

GENTIER, I. et al. Fine and gross motor skills differ between healthy-weight and obese children. **Research in developmental disabilities**, v. 34, n. 11, p. 4043-4051, 2013b.

GERHARDT, C. et al. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 175, n. 1, p. 81-92, 2001.

GESTA, S.; TSENG, Y.-H.; KAHN, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 242-256, 2007.

GIBBS, B. G.; FORSTE, R. Breastfeeding, parenting, and early cognitive development. **The Journal of pediatrics**, v. 164, n. 3, p. 487-493, 2014.

GILLMAN, M. W. The first months of life: a critical period for development of obesity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 87, n. 6, p. 1587-1589, 2008.

GLASS, G. A.; GERSHON, D. Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: loss of superoxide dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 103, n. 4, p. 1245-1253, 1981.

GOING, S. B. et al. Percent body fat and chronic disease risk factors in US children and youth. **American journal of preventive medicine**, v. 41, n. 4, p. s77-s86, 2011.

GOLLEY, R. K. et al. Diet quality of UK infants is associated with dietary, adiposity, cardiovascular, and cognitive outcomes measured at 7–8 years of age. **The Journal of nutrition**, v. 143, n. 10, p. 1611-1617, 2013.

GOODMAN, H. M. **Basic medical endocrinology**. Elsevier Inc, 4th Edition, California. 2009.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology & behavior**, v. 94, n. 2, p. 206-218, 2008.

GOOSSENS, G. H.; BLAAK, E. E. Adipose tissue dysfunction and impaired metabolic health in human obesity: a matter of oxygen? **Frontiers in endocrinology**, v. 6, n. 55, p.1-15, 2015.

GOYEN, T.A.; LUI, K. Developmental coordination disorder in “apparently normal” schoolchildren born extremely preterm. **Archives of disease in childhood**, v. 94, n. 4, p. 298-302, 2009.

GRANTHAM-MCGREGOR, S. et al. Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. **Lancet**, v. 369, n. 9555, p. 60-70, 2007.

GRUMMER-STRAWN, L. M. et al. Use of World Health Organization and CDC growth charts for children aged 0-59 months in the United States. **Recommendations and Reports: Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) / Centers for Disease Control**. v. 10, n. 59, p. 1-15, 2010.

GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes & metabolism**, v. 30, n. 1, p. 13-19, 2004.

GÜNGÖR, N. K. Overweight and obesity in children and adolescents. **Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinoly**, v.6, n.3, p.129-143, 2014.

GUZZETTI, C. et al. Correlation between cortisol and components of the metabolic syndrome in obese children and adolescents. **Journal of endocrinological investigation**, v. 37, n. 1, p. 51-56, 2014.

HÄGER, A. et al. Body fat and adipose tissue cellularity in infants: a longitudinal study. **Metabolism**, v. 26, n. 6, p. 607-614, 1977.

HAMILL, P. V. et al. NCHS growth curves for children birth-18 years. **Vital and Health Statistics. Series 11, Data from the National Healthy Survey**, v. 165, p. 1-74, 1977.

HAN, J. C. et al. Lower brain-derived neurotrophic factor in patients with Prader-Willi syndrome compared to obese and lean control subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3532-3536, 2010.

HARRIS, R. B. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 3, p. 414-423, 2014.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiology & behavior**, v. 83, n. 4, p. 653-658, 2004.

HEDRICK, J. A.; MORALES, J.; ZLOTNIK, A. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 90-96, 1999.

HEINONEN, K. et al. Prenatal and postnatal growth and cognitive abilities at 56 months of age: a longitudinal study of infants born at term. **Pediatrics**, v. 121, n. 5, p. 1325-1333, 2008.

HOF, M. H. Association between infancy BMI peak and body composition and blood pressure at age 5-6 years. **PloS One**, v. 8, n. 12, e80517, 2013.

HUANG, C.-J. et al. Brain-derived neurotrophic factor expression ex vivo in obesity. **Physiology & behavior**, v. 123, p. 76-79, 2014a.

HUANG, F. et al. Effect of six-month lifestyle intervention on adiponectin, resistin and soluble tumor necrosis factor- α receptors in obese adolescents. **Endocrine journal**, v. 61, n. 9, p. 921-931, 2014b.

IRIGOYEN, M. et al. Early onset of overweight and obesity among low-income 1-to 5-year olds in New York City. **Journal of Urban Health**, v. 85, n. 4, p. 545-554, 2008.

ITOH, M. et al. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. **International journal of inflammation**, v. 2011; p. 720926-720945, 2011.

JEFFERY, A. N. et al. Adiponectin in childhood. **International Journal of Pediatric Obesity**, v. 3, n. 3, p. 130-140, 2008.

JERMENDY, A. et al. Association between toll-like receptor polymorphisms and serum levels of tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in obese children. **Medical Science Monitor**, v. 16, n. 4, p. 180-185, 2010.

JIANG, N. M. et al. Febrile illness and pro-inflammatory cytokines are associated with lower neurodevelopmental scores in Bangladeshi infants living in poverty. **BMC pediatrics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

JIN, Y. J. et al. BDNF levels in adipose tissue and hypothalamus were reduced in mice with MSG-induced obesity. **Nutritional neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 376-382, 2015.

JOHNSON, M. H. Functional brain development in humans. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 7, p. 475-483, 2001.

JUONALA, M. et al. Childhood environmental and genetic predictors of adulthood obesity: the cardiovascular risk in young Finns study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 9, p. e1542-e1549, 2011.

KAMEI, M.; CARMAN, C. V. New observations on the trafficking and diapedesis of monocytes. **Current opinion in hematology**, v. 17, n. 1, p. 43-52, 2010.

KEIL, M. F. Salivary cortisol: a tool for biobehavioral research in children. **Journal of pediatric nursing**, v. 27, n. 3, p. 287-289, 2012.

KELLER, P. S. et al. Interactions between salivary cortisol and alpha-amylase as predictors of children's cognitive functioning and academic performance. **Physiology & behavior**, v. 105, n. 4, p. 987-995, 2012.

KHALAJ, N.; AMRI, S. Mastery of gross motor skills among preschool obese children. **Ovidius University Annals, Series Physical Education and Sport/Science, Movement and Health**, v. 13, n. 2, p. 656-662, 2013.

KIM, J. et al. Trends in Overweight from 1980 through 2001 among Preschool-Aged Children Enrolled in a Health Maintenance Organization. **Obesity**, v. 14, n. 7, p. 1107-1112, 2006.

KIM, K.-H. et al. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11252-11256, 2001.

KNITTLE, J. et al. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. **Journal of Clinical Investigation**, v. 63, n. 2, p. 239-246, 1979.

KÖRNER, A. et al. New predictors of the metabolic syndrome in children—role of adipocytokines. **Pediatric research**, v. 61, n. 6, p. 640-645, 2007.

KÖRNER, A. et al. Adiponectin expression in humans is dependent on differentiation of adipocytes and down-regulated by humoral serum components of high molecular weight. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 337, n. 2, p. 540-550, 2005.

KOTANI, Y. et al. Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. **Clinical endocrinology**, v. 61, n. 4, p. 418-423, 2004.

KREBS, N. F. Assessment of child and adolescent overweight and obesity. **Pediatrics**, v. 120, s. 4, p. 193-228, 2007.

KUCZMARSKI, R. J. et al. 2000 CDC Growth Charts for the United States: methods and development. **Vital and health statistics. Series 11, Data from the national health survey**, n. 246, p. 1-190, 2002.

LACASA, D. et al. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. **Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 868-877, 2007.

LANDGRAF, K. et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1249-1261, 2015.

LAUDES, M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. **Journal of molecular endocrinology**, v. 46, n. 2, p. 65-72, 2011.

LEBENSZTEJN, D. et al. Tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors in obese children with NAFLD. **Advances in medical sciences**, v. 55, n. 1, p. 74-79, 2010.

LEE, M. J. et al. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1842, n. 3, p. 473-481, 2014.

LEONARDO, C. C.; PENNYPACKER, K. R. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. **Journal of Neuroinflammation**, v. 6, p. 13-19, 2009.

LEONI, M. C. et al. Impact of child obesity on adipose tissue physiology: assessment of adipocytokines and inflammatory cytokines as biomarkers of obesity. **Pediatric reports**, v. 2, n. 2, p.e19-e33 ,2010.

LEUNISSEN, R. W. et al. Timing and tempo of first-year rapid growth in relation to cardiovascular and metabolic risk profile in early adulthood. **Jama**, v. 301, n. 21, p. 2234-2242, 2009.

LI, S. et al. Adiposity trajectory and its associations with plasma adipokine levels in children and adolescents—A prospective cohort study. **Obesity**, v. 24, n. 2, p. 408-416, 2016.

LIU, X. et al. Effects of energy status and diet on Bdnf expression in the ventromedial hypothalamus of male and female rats. **Physiology & behavior**, v. 130, p. 99-107, 2014.

LUCAS, S. M. et al. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, S1, p. 232-240, 2006.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

MACEWAN, D. J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cellular signalling**, v. 14, n. 6, p. 477-492, 2002.

MAJKA, S. M.; BARAK, Y.; KLEMM, D. J. Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. **Stem Cells**, v. 29, n. 7, p. 1034-1040, 2011.

MAROSI, K.; MATTSO, M. P. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 2, p. 89-98, 2014.

MARQUÉS-ITURRIA, I. et al. The interaction effect between BDNF val66met polymorphism and obesity on executive functions and frontal structure. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 165, n. 3, p. 245-253, 2014.

MARSEGLIA, L. et al. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 378-400, 2014.

- MARTOS-MORENO, G. Á. et al. Adipokines in childhood obesity. **Vitamins & Hormones**, v. 91, p. 107-142, 2013.
- MARTOS-MORENO, G. Á. et al. Effect of Weight Loss on High-Molecular Weight Adiponectin in Obese Children. **Obesity**, v. 18, n. 12, p. 2288-2294, 2010.
- MATUSIK, P. et al. Oxidative/Antioxidative Status in Obese and Sport Trained Children: A Comparative Study. **BioMed research international**, v. 2015, p. 315747-315765, 2015.
- MEYER, L. K. et al. Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. **Adipocyte**, v. 2, n. 4, p. 217-226, 2013.
- MICHELS, N. et al. Children's morning and evening salivary cortisol: pattern, instruction compliance and sampling confounders. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 77, n. 1, p. 27-35, 2011.
- MILLER, A. A.; SPENCER, S. J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. **Brain, behavior and immunity**, v. 42, p. 10-21, 2014.
- MILLER, A. L. et al. Obesity-Related Hormones in Low-Income Preschool-Age Children: Implications for School Readiness. **Mind, Brain, and Education**, v. 7, n. 4, p. 246-255, 2013.
- MILLER, A. L. et al. Obesity-associated biomarkers and executive function in children. **Pediatric research**, v. 77, n. 1-2, p. 143-147, 2014.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Saúde na escola**. Ministério da Saúde, 2009.
- MOLGAT, A. S. et al. The activation state of macrophages alters their ability to suppress preadipocyte apoptosis. **Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 1, p. 21-29, 2012.
- MOLNAR, D.; DECSI, T.; KOLETZKO, B. Reduced antioxidant status in obese children with multimetabolic syndrome. **International journal of obesity**, v. 28, n. 10, p. 1197-1202, 2004.
- MOND, J. M. et al. Associations between obesity and developmental functioning in pre-school children: a population-based study. **International journal of obesity**, v. 31, n. 7, p. 1068-73, 2007.
- MORENO-NAVARRETE, J.M.; FERNÁNDEZ-REAL, J.M. Adipocyte Differentiation. IN: SYMONDS, M.E. **Adipose Tissue Biology**. Springer Science & Business Media, 2011.
- MUIR, L. A. et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. **Obesity**, v. 24, n. 3, p. 597-605, 2016.
- MÜLLER, R. M. et al. Prevalence of overweight and associated factors in under-five-year-old children in urban population in Brazil. **Brazilian Journal of Epidemiology**, v. 17, n. 2, p. 285-296, 2014.

MURDOLO, G. et al. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. **Biochimie**, v. 95, n. 3, p. 585-594, 2013.

MURRAY, G. K. et al. Infant developmental milestones and subsequent cognitive function. **Annals of neurology**, v. 62, n. 2, p. 128-136, 2007.

MUSHTAQ, M. U. et al. Prevalence and socioeconomic correlates of overweight and obesity among Pakistani primary school children. **BMC Public Health**, v. 11, n. 1, p. 1, 2011.

NASCIMENTO, V. G.; BERTOLI, C. J.; LEONE, C. Ratio of weight to height gain: a useful tool for identifying children at risk of becoming overweight or obese at preschool age. **Clinics**, v. 66, n. 7, p. 1223-1226, 2011.

NEELON, S. E. B. et al. Age of achievement of gross motor milestones in infancy and adiposity at age 3 years. **Maternal and child health journal**, v. 16, n. 5, p. 1015-1020, 2012.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.

NERVIK, D. et al. The relationship between body mass index and gross motor development in children aged 3 to 5 years. **Pediatric Physical Therapy**, v. 23, n. 2, p. 144-8, 2011.

NIEMELÄ, S. et al. Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. **Topics in Tissue Engineering**, v. 4, n. 1, p. 26, 2008.

NISHIMURA, S. et al. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. **Diabetes**, v. 56, n. 6, p. 1517-1526, 2007.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999-2010. **Jama**, v. 307, n. 5, p. 483-490, 2012.

OGDEN, C. L. et al. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. **Jama**, v. 311, n. 8, p. 806-814, 2014.

OHASHI, K. et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 9, p. 6153-6160, 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. **Circulation research**, v. 102, n. 2, p. 218-225, 2008.

OKAMOTO, Y. et al. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. **Clinical Science**, v. 110, n. 3, p. 267-278, 2006.

OLIVER, S. R. et al. Increased oxidative stress and altered substrate metabolism in obese children. **International Journal of Pediatric Obesity**, v. 5, n. 5, p. 436-444, 2010.

ONG, K. K. et al. Infancy weight gain predicts childhood body fat and age at menarche in girls. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1527-1532, 2009.

ONG, K. K.; LOOS, R. J. Rapid infancy weight gain and subsequent obesity: systematic reviews and hopeful suggestions. **Acta paediatrica**, v. 95, n. 8, p. 904-908, 2006.

ONIS, M. Assessment of differences in linear growth among populations in the WHO Multicentre Growth Reference Study. **Acta paediatrica**, v. 95, n. 450, p. 56-65, 2006a.

ONIS, M. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. **Acta paediatrica**, v. 95, n. 450, p. 76-85, 2006b.

OTTO, T. C.; LANE, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 4, p. 229-242, 2005.

OU, X. et al. Brain gray and white matter differences in healthy normal weight and obese children. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 42, n. 5, p. 1205-1213, 2015.

PAREDES, S.; RIBEIRO, L. Cortisol: the villain in Metabolic Syndrome? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 60, n. 1, p. 84-92, 2014.

PATSOURIS, D. et al. Glucocorticoids and thiazolidinediones interfere with adipocyte-mediated macrophage chemotaxis and recruitment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 45, p. 31223-31235, 2009.

PAZ-FILHO, G. J. Leptin replacement improves cognitive development. **PLoS One**, v. 3, n. 8, p. 3098-3104, 2008.

PEDRAZA, D. F.; QUEIROZ, D. D. Micronutrientes no crescimento e desenvolvimento infantil. **Revista brasileira de crescimento e desenvolvimento humano**, v. 21, n. 1, p. 156-171, 2011.

PETTERSSON, P. et al. Adipocyte precursor cells in obese and nonobese humans. **Metabolism**, v. 34, n. 9, p. 808-812, 1985.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

PILLON, N. J.; SOULAGE, C. O. Lipid Peroxidation by-Products and the Metabolic Syndrome. IN: CATALA, A. **Lipid Peroxidation**. InTech, 2012.

PIRES, B. et al. Comparação entre as curvas de crescimento do Centers for Disease Control and Prevention e da Organização Mundial da Saúde para lactentes com idade de seis a 12 meses. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 4, p. 314-9, 2010.

PORTNEY, L. G.; WATKINS M. **Foundations of Clinical Research: Applications to Practice**. Prent Hall, 1999.

POWER, C.; LI, L.; HERTZMAN, C. Associations of early growth and adult adiposity with patterns of salivary cortisol in adulthood. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 11, p. 4264-4270, 2006.

PRODAM, F. et al. High-end normal adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels are associated with specific cardiovascular risk factors in pediatric obesity: a cross-sectional study. **BMC medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-23, 2013.

REINERT, K. R.; PO'E, E. K.; BARKIN, S. L. The relationship between executive function and obesity in children and adolescents: a systematic literature review. **Journal of obesity**, v. 2013, p. 820956-820966, 2013.

RENTERÍA, I. et al. Factores que inciden el daño oxidativo en niños con obesidad: estudio piloto. **Nutricion hospitalaria**, v. 31, n. n04, p. 1499-1503, 2015.

ROCHA, V. Z. et al. Interferon- γ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation A Role for Adaptive Immunity in Obesity. **Circulation research**, v. 103, n. 5, p. 467-476, 2008.

ROCHA, N.P. et al. Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are associated with cognitive performance in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 29, n. 4, p. 527-531, 2014.

ROMACHO, T. et al. Nutritional ingredients modulate adipokine secretion and inflammation in human primary adipocytes. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 865-886, 2015.

RONQUE, E. R. V. et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade em escolares de alto nível socioeconômico em Londrina, Paraná, Brasil. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 6, p. 709-717, 2005.

ROSAS-VARGAS, H.; MARTÍNEZ-EZQUERRO, J. D.; BIENVENU, T. Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. **Archives of medical research**, v. 42, n. 6, p. 482-494, 2011.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 7, n. 12, p. 885-896, 2006.

ROTH, C. L. et al. Brain-derived neurotrophic factor and its relation to leptin in obese children before and after weight loss. **Metabolism**, v. 62, n. 2, p. 226-234, 2013.

ROTH, C. L. et al. Changes in adipose-derived inflammatory cytokines and chemokines after successful lifestyle intervention in obese children. **Metabolism**, v. 60, n. 4, p. 445-452, 2011.

RUPÉREZ, A. I. et al. Are Catalase– 844A/G Polymorphism and Activity Associated with Childhood Obesity? **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 16, p. 1970-1975, 2013.

RUSSELL, M. et al. Relative growth hormone deficiency and cortisol excess are associated with increased cardiovascular risk markers in obese adolescent girls. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 8, p. 2864-2871, 2009.

SABIN, M. A. et al. Viewpoint article: Childhood obesity—looking back over 50 years to begin to look forward. **Journal of paediatrics and child health**, v. 51, n. 1, p. 82-86, 2015.

SAHOO, K. et al. Childhood obesity: causes and consequences. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v.4, n.2, p.187-92, 2015.

SAMAAN, M. C. et al. Chemokine (CC motif) Ligand 2 is a potential biomarker of inflammation & physical fitness in obese children: a cross-sectional study. **BMC pediatrics**, v. 13, n. 1, p. 47, 2013.

SANDJAJA, B. K. et al. Relationship between anthropometric indicators and cognitive performance in Southeast Asian school-aged children. **The British Journal of Nutrition**, v. 110, s. 3, p. 57-64, 2013.

SAVINI, I. et al. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013.

SAVINO, F. et al. Breast milk hormones and their protective effect on obesity. **International journal of pediatric endocrinology**, v. 2009, n. 1, p. 1-23, 2009.

SBARBATI, A. et al. Obesity and inflammation: evidence for an elementary lesion. **Pediatrics**, v. 117, n. 1, p. 220-223, 2006.

SCHIPPER, H. et al. Systemic inflammation in childhood obesity: circulating inflammatory mediators and activated CD14++ monocytes. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2800-2810, 2012.

SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. The role of TNF α in adipocyte metabolism. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 10, n. 1, p. 19-29, 1999.

SETHI, J. K.; VIDAL-PUIG, A. J. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 6, p. 1253-1262, 2007.

SETHI, J. K. et al. Characterisation of receptor-specific TNF α functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors. **FEBS letters**, v. 469, n. 1, p. 77-82, 2000.

SFAR, S. et al. Antioxidant enzymes activities in obese Tunisian children. **Nutrition journal**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

SILVEIRA, J. A. et al. Secular trends and factors associated with overweight among Brazilian preschool children: PNSN-1989, PNDS-1996, and 2006/07. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 3, p. 258-266, 2014.

SILVERWOOD, R. J. et al. BMI peak in infancy as a predictor for later BMI in the Uppsala Family Study. **Journal International of Obesity**, v. 33, n. 8, p. 929-937, 2009.

SINDHU, S. et al. Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: significance for metabolic inflammation. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0133494-e0133516, 2015.

SIVIERO-MIACHON, A. A.; SPINOLA-CASTRO, A. M.; GUERRA-JUNIOR, G. Adiposity in childhood cancer survivors: insights into obesity physiopathology. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 190-200, 2009.

SKILTON, M. R. et al. Weight gain in infancy and vascular risk factors in later childhood. **Pediatrics**, v. 131, n. 6, p. e1821-e1828, 2013.

SKINNER, A. C. et al. Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. **Pediatrics**, v. 125, n. 4, p. e801-e809, 2010.

SLINING, M. et al. Infant overweight is associated with delayed motor development. **The Journal of Pediatrics**, v. 157, n. 1, p. 20-25, 2010.

SOCIEDADE MINEIRA DE PEDIATRIA. **A Culpa é Sua?** Belo Horizonte, 2015. (Cartilha).

SORISKY, A.; MOLGAT, A. S.; GAGNON, A. Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go? **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 1, p. 67-75, 2013.

SPORIŠ, G.; BADRIĆ, M.; MILJKOVIĆ, Z. Do the overweight and obesity effect on motor ability level Among girls? **Sport Science**, v. 7, n. 2, p. 36-43, 2014.

SPYRIDES, M. H. C. et al. Efeito das práticas alimentares sobre o crescimento infantil. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 5, n. 2, p. 145-153, 2005.

SRIVASTAVA, S. et al. Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to β -adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. **Cardiovascular research**, v. 74, n. 3, p. 445-455, 2007.

STEFAN, N. et al. Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4652-4656, 2002.

STIEG, M. R. Leptin: a hormone linking activation of neuroendocrine axes with neuropathology. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p. 47-57, 2015.

STRACZKOWSKI, M. et al. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor- α system. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 10, p. 4602-4606, 2002.

SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes role of free fatty acids and tumor necrosis

factor α . **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 25, n. 10, p. 2062-2068, 2005.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 1, p. 33-39, 2010.

SUGANAMI, T.; TANAKA, M.; OGAWA, Y. Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation. **Endocrine journal**, v. 59, n. 10, p. 849-857, 2012.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094-2101, 2011.

TAANILA, A. et al. Infant developmental milestones: a 31-year follow-up. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 47, n. 9, p. 581-6, 2005.

TAM, C. S. et al. Adipose tissue remodeling in children: the link between collagen deposition and age-related adipocyte growth. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 4, p. 1320-1327, 2012.

TERRADO, J. Soluble TNF receptors partially protect injured motoneurons in the postnatal CNS. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3443-3447, 2000.

TILLING, K. et al. Is infant weight associated with childhood blood pressure? Analysis of the Promotion of Breastfeeding Intervention Trial (PROBIT) cohort. **International journal of epidemiology**, v. 40, n. 5, p. 1227-1237, 2011.

TORRES-LEAL, F. L. et al. **Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance**. IN: ARORA, S. Endocrinology and Metabolism. Insulin resistance, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/insulin-resistance/adipose-tissue-inflammation-and-insulin-resistance>>. Acesso em: 18 de nov 2015.

TOUNIAN, P. Programming towards childhood obesity. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. Suppl. 2, p. 30-41, 2011.

TRAN, B. et al. Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies. **Experimental diabetes research**, v. 2012, p.683680-683687, 2012.

UDAGAWA, J. Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. **Congenital anomalies**, v. 47, n. 3, p. 77-83, 2007.

VAN BAAR, A.L. et al. Functioning at school age of moderately preterm children born at 32 to 36 weeks' gestacional age. **Pediatrics**, v.124, n. 1, p. 251-257, 2009.

VELDHORST, M. A. et al. Increased scalp hair cortisol concentrations in obese children. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 99, n. 1, p. 285-290, 2013.

VELDWIJK, J. et al. Body mass index and cognitive ability of young children. **Obesity facts**, v. 4, n. 4, p. 264-269, 2011.

VIELMA, S. A. et al. Adipocytes as immune regulatory cells. **International immunopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 224-231, 2013.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **International journal of obesity**, v. 30, n. 3, p. 400-418, 2006.

VOGELS, N. et al. Determinants of overweight in a cohort of Dutch children. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 4, p. 717-724, 2006.

WANG, Y. et al. Individual genetic variations related to satiety and appetite control increase risk of obesity in preschool-age children in the STRONG kids program. **Human heredity**, v. 75, n. 2-4, p. 152-159, 2013.

WAROLIN, J. et al. The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy Black and White American youth. **Pediatric obesity**, v. 9, n. 1, p. 43-52, 2014.

WENG, S. F. et al. Systematic review and meta-analyses of risk factors for childhood overweight identifiable during infancy. **Archives of disease in childhood**, v. 97, n. 12, p. 1019-1026, 2012.

WENNERBERG, A. Serum adiponectin levels, neuroimaging, and cognition in the Mayo clinic study of aging. *Journal of Alzheimer's Disease*, (preprint) p. 1-9, 2016.

WHITE, U. A.; STEPHENS, J. M. **Transcriptional Control of Adipogenesis and Fat Cell Gene Expression**. IN: LEFF, T.; GRANNEMAN, J.G. *Adipose Tissue in Health and Disease*, Wiley-Balckwell, 2010.

WHITNEY, N. P. et al. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, n. 6, p. 1343-1359, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Anthro (version 3.2. 2, January 2011) and macros**. World Health Organization, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Facts sheets. Obesity and overweight**. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 15 de jun 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategy on diet, physical activity and health**. 2004. Disponível em: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_english_web.pdf>. Acesso em: 29 de fev 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Population-based approaches to childhood obesity prevention**. 2012. Disponível em: <www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html>. Acesso em: 29 de fev 2016

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Facts and figures on childhood obesity. Commission on Ending Childhood Obesity**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/end-childhood-obesity/facts/en/#>>. Acesso em: 29 de fev 2016.

WOSISKI-KUHN, M. et al. Glucocorticoid receptor activation impairs hippocampal plasticity by suppressing BDNF expression in obese mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 42, p. 165-177, 2014.

XIAO, L. et al. The effect of squalane-dissolved fullerene-C60 on adipogenesis-accompanied oxidative stress and macrophage activation in a preadipocyte-monocyte co-culture system. **Biomaterials**, v. 31, n. 23, p. 5976-5985, 2010.

XU, H.; HOTAMISLIGIL, G. S. Signaling pathways utilized by tumor necrosis factor receptor 1 in adipocytes to suppress differentiation. **FEBS letters**, v. 506, n. 2, p. 97-102, 2001.

XU, H.; SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26287-26295, 1999.

XU, L. et al. Roles of chemokines and chemokine receptors in obesity-associated insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1563-1579, 2015.

YEOM, C. W. et al. Association of periphery BDNF level with cognition, attention and behavior in preschool children. **Child and Adolescent Psychiatry and Mental Health**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2016.

YOSHINAGA, M. et al. Adipokines and the prediction of the accumulation of cardiovascular risk factors or the presence of metabolic syndrome in elementary school children. **Circulation Journal**, v. 72, n. 11, p. 1874-1878, 2008.

YU, Z. et al. Intelligence in relation to obesity: a systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 9, p. 656-670, 2010.

YU, Z. et al. Birth weight and subsequent risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews**, v. 12, n. 7, p. 525-542, 2011.



ZARBAN, A. et al. Effect of Vitamin C and E Supplementation on Total Antioxidant Content of Human Breastmilk and Infant Urine. **Breastfeeding Medicine**, v. 10, n. 4, p. 214-217, 2015.

ZHANG, M. et al. Abnormal adipokines associated with various types of obesity in Chinese children and adolescents. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 24, n. 1, p. 12-21, 2011.

ZHU, Y. et al. Overweight and obesity-induced oxidative stress in children. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 19, n. 5, p. 353-359, 2006.

ZOU, C. C.; LIANG, L.; HONG, F. Relationship between insulin resistance and serum levels of adiponectin and resistin with childhood obesity. **Indian pediatrics**, v. 44, n. 4, p. 275, 2007.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

		Comitê de Ética em Pesquisa			
PARECER CONSUBSTANCIADO			Nº de protocolo no Comitê: 085/2012		
X PROJETO DE PESQUISA					
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO					

I - Identificação:

- Título do projeto:** Marcadores inflamatórios, cortisol e desenvolvimento infantil em bebês com sobrepeso e obesidade aos seis e doze meses de idade.
- Pesquisador responsável:** Ana Cristina Resende Carrapatos - Mestre
- Instituição responsável pela realização:** UFMG
- Instituição/Local onde se realizará:** ESE - Diamantina/MG
- Área de Concentração:** Ciências da Saúde
- Data de apresentação ao CEP:** 25/10/2012; apresentação da declaração das instituições co-participantes, com o Termo de Referência pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (parecer CONEP 0212/10), em 14/12/12.

II - Objetivos:

Geral: Avaliar e comparar as concentrações dos marcadores inflamatórios salivares (CRP e TNF α), as concentrações de cortisol salivar e o desenvolvimento infantil em bebês com peso normal, sobrepeso e obesidade aos seis meses e doze meses de idade.

Específicos:

- Verificar se existe diferença entre as concentrações dos marcadores inflamatórios na saliva (CRP e TNF α) entre bebês com peso normal, sobrepeso e obesidade aos seis e doze meses de idade;
- Verificar se existe diferença entre as concentrações de cortisol salivar em bebês com peso normal, sobrepeso e obesidade aos seis e doze meses de idade;
- Verificar se existe diferença em relação ao desenvolvimento motor e cognitivo de bebês com peso normal, sobrepeso e obesidade aos seis e doze meses de idade;
- Verificar se existe relação entre as concentrações dos marcadores inflamatórios salivares (CRP e TNF α) e de cortisol salivar de bebês aos seis e doze meses de idade;
- Verificar se existe relação entre as concentrações de cortisol salivar e o desenvolvimento cognitivo de bebês aos seis e doze meses de idade;
- Verificar se existe relação entre as concentrações dos marcadores inflamatórios salivares (CRP e TNF α) e o desenvolvimento cognitivo de bebês aos seis e doze meses de idade;
- Verificar se existe relação entre as concentrações dos marcadores inflamatórios salivares (CRP e TNF α) na saliva e no plasma aos doze meses de idade.

III - Sumário do projeto:

1. Descrição e caracterização da amostra: estudo longitudinal que iniciará com bebês aos seis meses de idade, sendo estes reavaliados novamente aos doze meses de idade. Os bebês deverão ser cadastrados nas Estratégias de Saúde da Família (ESF) do município de Diamantina. O cálculo amostral foi baseado no estudo de Russell e a partir dos valores da variável cortisol. Neste estudo foi identificada diferença mínima significativa entre os grupos de 10,6 µg e de 20,2 µg, sendo necessários 25 indivíduos em cada grupo (grupo eutrófico, grupo sobrepeso e grupo obeso), totalizando uma amostra de 75 indivíduos.

2. Critérios de inclusão e exclusão: Para serem incluídos no estudo os bebês deverão apresentar no grupo eutrófico IMC maior ou igual ao percentil 3 e menor que o percentil 85; no grupo sobrepeso IMC maior ou igual ao percentil 85 e menor que o percentil 90,9; no grupo obeso IMC maior ou igual ao percentil 90,9. Serão excluídos do estudo os bebês que apresentem desnutrição ou alguma doença sistêmica ou imune que afete o crescimento e desenvolvimento infantil, bem como bebês que tenham apresentado algum processo infeccioso (febre, gripe, diarreia, etc.) nos últimos 30 dias tenham realizado alguma cirurgia recente, apresentem doenças ósseas ou pericardiais e utilizem alguma medicação.

3. Adequação da metodologia: estudo longitudinal que iniciará com bebês aos seis meses de idade, sendo estes reavaliados novamente aos doze meses de idade. Os bebês deverão ser cadastrados nas Estratégias de Saúde da Família (ESF) do município de Diamantina. Inicialmente, será realizada uma visita à Secretaria Municipal de Saúde de Diamantina, na qual os objetivos e procedimentos do estudo serão esclarecidos e será solicitada permissão para a realização do estudo nas ESF. Durante a visita à ESF para realizar um levantamento com os Agentes Comunitários de Saúde de todas as crianças até os seis meses de idade cadastradas, no qual será solicitado o endereço residencial das crianças. Em seguida será realizada uma visita no domicílio de cada criança para explicar aos pais e/ou responsáveis os objetivos e procedimentos do estudo. Caso possam participar do estudo, será solicitada autorização dos mesmos, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após a assinatura do TCLE os pais e/ou responsáveis deverão responder algumas perguntas, conforme a laborada na ficha de dados. Os examinadores deverão ler os itens para os pais e/ou responsáveis, bem como esclarecer suas dúvidas. Além disso, será aplicada a escala ABEP para avaliação do nível socioeconômico. No mesmo dia, o bebê será inspecionado a respeito da sua condição de saúde, com medida da temperatura corporal e avaliação bucal, para exclusão de qualquer processo infeccioso no local. Os bebês serão encaminhados para a Clínica de Fisioterapia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) a fim de aferir o peso e o comprimento, bem como identificar o IMC. Após essas medidas, o bebê será avaliado através do teste Bayley III, no mesmo local. Todos os bebês serão avaliados no mesmo local, no Laboratório de Pediatria, que apresenta todas as características necessárias para a condução do teste. O teste será administrado, individualmente, de forma

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rodovia MG-367, Km 583, nº. 5000, Alto da Jacoba, CEP 39100-000 - Diamantina/MG - Brasil (38) 3532.1240
http://www.ufvjm.edu.br/pesquisa/cep.html


30/11/12

padronizada, com a utilização do kit específico. O tempo de aplicação varia entre 50 e 90 minutos, de acordo com a idade da criança. Nesse mesmo dia os tubos Salivette® serão entregues para os pais e/ou responsáveis, juntamente com todas as orientações para a coleta. Todos os procedimentos de coleta deverão ser realizados, no primeiro momento, aos seis meses de idade e, no segundo momento, aos doze meses de idade. Será permitida uma variação de ± 15 dias. Aos seis meses de idade será avaliada a história alimentar pregressa do bebê através de uma entrevista. A partir dos seis meses serão coletadas também informações do diário alimentar, com o registro da alimentação durante uma semana. O diário será fornecido aos pais uma vez por mês até completar os doze meses de idade. Aos doze meses de idade os bebês também serão submetidos a uma coleta de sangue, que será realizada após todas as outras avaliações, em um dia previamente agendado pelos pais. Os pesquisadores passarão primeiro por um treinamento para aplicação dos testes e medidas e será estabelecida a confiabilidade para a realização das medidas de peso, estatura e para o teste de desenvolvimento motor.

☐ **Adequação das condições:** Os sujeitos serão abordados em suas próprias residências pelos pesquisadores para esclarecer sobre o propósito da pesquisa e obtenção do consentimento. Informação aos pais dos sujeitos sobre o horário da coleta. As condições para obtenção das informações do ponto de vista de sigilo e privacidade estão adequadas.

IV - Comentários do relator frente à Resolução nº. 196/96/CNS e complementares em particular sobre:

☐ **Justificativa do uso do placebo (caso haja):** não se aplica

☐ **Justificativa da suspensão terapêutica (wash out):** não se aplica

☐ **Estrutura do protocolo:** Anexados foram apresentados a folha de rosto; carta de encaminhamento; link do Tópicos, TCLE, cópia digital e impressa, protocolo, organograma e cronograma.

☐ **Análise de riscos e benefícios:** Os benefícios do estudo serão identificação precoce de obesidade infantil, identificação de marcadores que podem produzir complicações de saúde ao longo da vida, bem como identificação de atraso do desenvolvimento infantil. Além disso, todos os pais serão informados a respeito do crescimento e desenvolvimento de seu filho, bem como possíveis doenças sistêmicas e hematológicas tais como anemias, alterações neoplásicas, infecções entre outras. Caso sejam identificadas essas alterações, os voluntários serão encaminhados para as Clínicas de Nutrição, Fisioterapia e Odontologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Caso necessário, os bebês também serão encaminhados para consulta médica. Durante a primeira etapa do estudo, aos seis meses de idade, os riscos são mínimos, uma vez que o estudo envolve mensurações simples e não invasivas. Os riscos associados são desconforto e cansaço dos bebês durante a avaliação do desenvolvimento infantil. No entanto, nessa avaliação serão observados comportamentos habituais do bebê e caso esses apresentem algum desconforto, os pesquisadores poderão interromper os testes até que os mesmos se acalmem. Já na segunda etapa do estudo, aos doze meses de idade, além dos riscos acima mencionados, o bebê também apresentará o risco de dor e hematoma ao realizar a coleta sanguínea. Para minimizar essas questões, o exame será realizado por profissionais experientes e treinados para coleta de sangue em bebês. Todos os cuidados quanto à assepsia serão realizados como lavagem das mãos, uso de luvas durante o procedimento, assepsia do local da coleta e coleta da amostra com seringas e agulhas descartáveis.

☐ **Adequação do consentimento e forma de obtê-lo:** O TCLE está de acordo com a Resolução 196/96, considerando itens importantes, tais como: linguagem acessível; liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização; garantia do sigilo e privacidade; riscos e benefícios; forma de ressarcimento; contatos do pesquisador e da CFP/UFVJM, dentre outros. Os pesquisadores, por meio de abordagem direta, durante a avaliação inicial, terão exposição dos objetivos e métodos utilizados na pesquisa, apresentando o TCLE ao voluntário, que poderá sanar todas as suas dúvidas sobre a pesquisa, assinando, se assim desejar o termo, permanecendo com uma cópia com todos os dados e contatos necessários para seu esclarecimento.

☐ **Informação adequada quanto ao financiamento:** A pesquisa necessitará de recursos financeiros. O recurso para a compra do material a ser utilizado será alocado por meio de agências de fomento e recurso PROAP destinado a programa de Pós Graduação.

☐ **Lista de centros (para estudos multicêntricos):** não se aplica

☐ **Outros**

V - Pendências:

VI - Observações

1. Segundo a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, de 21/03/11, há obrigatoriedade de rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito da pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador, que deverá também apor sua assinatura na última página do referido termo.

VII - Motivos da não aprovação

VIII- Parecer Consubstanciado do CEP:☒ **APROVADO.** Receberá parecer e certificado do Comitê.☐ **PENDENTE.** Certificado do Comitê sujeito à resolução das pendências em tempo previsto.☐ **NÃO APROVADO.** Receberá apenas o parecer do CEP. Submeterá novo projeto ao Comitê.

Observações ao pesquisador:

Para projetos aprovados

- 1) Somente estará autorizado o início da pesquisa, após aprovação do protocolo pelo CEP.
- 2) O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.b).
- 3) O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.2), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de um medicamento a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeram ação imediata.
- 4) O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- 5) Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).
- 6) Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente, em dezembro/13 e ao término do estudo, em dezembro de 2014. Considera-se como antídoto a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

IX- Data da reunião do CEP: 14 de dezembro de 2012.

P/

Prof.^a Thais Peixoto Galad Machado, Ph.D.
Coordenadora do CEP UFVJM

Rafael
Prof. Dr. Rosamery Aparecida Garcia Sanches
Vice-Coordenadora CEP/UFVJM



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Comitê de Ética em Pesquisa/CEP



Ofício nº. 011/2014

Diamantina, 05 de maio de 2014.

À Sua Senhoria, a Senhora,
Profª. Ana Cristina Resende Camargos
UFVJM

Assunto: Adendo ao Projeto de Pesquisa nº. 085/12

Senhora Professora,

O CEP/UFVJM, em sua 10ª reunião ordinária, realizada em 29 de abril de 2014, deu o seu parecer favorável à solicitação de alteração da faixa etária do projeto coordenado por V.Sª, intitulado: "Marcadores inflamatórios, cortisol e desenvolvimento infantil em bebês com sobrepeso e obesidades aos seis e doze meses de idade", para "entre seis meses e dois anos de idade, protocolado sob o nº. 085/12.

Atenciosamente,

Thais P. Gaiad Machado

Profª. Drª. Thais Peixoto Gaiad Machado
Coordenadora CEP/UFVJM

Profª. Drª. Thais Peixoto Gaiad Machado
Coordenadora CEP/UFVJM

ANEXO 2 - CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA BRASIL



O Critério de Classificação Econômica Brasil, enfatiza sua função de estimar o poder de compra das pessoas e famílias urbanas, abandonando a pretensão de classificar a população em termos de “classes sociais”. A divisão de mercado definida abaixo é de classes econômicas.

SISTEMA DE PONTOS

Posse de itens

	Quantidade de Itens				
	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	2	2	2	2
Videocassete e/ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	0	2	2	2	2

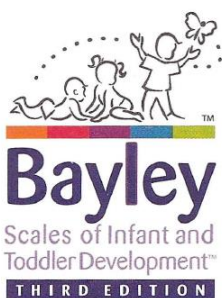
Grau de Instrução do chefe de família

Nomenclatura Antiga	Nomenclatura Atual	
Analfabeto/ Primário incompleto	Analfabeto/ Fundamental 1 Incompleto	0
Primário completo/ Ginásial incompleto	Fundamental 1 Completo / Fundamental 2 Incompleto	1
Ginásial completo/ Colegial incompleto	Fundamental 2 Completo/ Médio Incompleto	2
Colegial completo/ Superior incompleto	Médio Completo/ Superior Incompleto	4
Superior completo	Superior Completo	8

CORTES DO CRITÉRIO BRASIL

Classe	Pontos
A1	42 - 46
A2	35 - 41
B1	29 - 34
B2	23 - 28
C1	18 - 22
C2	14 - 17
D	8 - 13
E	0 - 7

ANEXO 3 - BAYLEY SCALES OF INFANT AND TODDLER DEVELOPMENT



Record Form

Child's name: _____

Sex: ☐ M ☐ F ID #: _____

Examiner's name: _____

School/Child care program: _____

Reason for referral: _____

Subtest Summary Scores

Subtest	Total Raw Score	Scaled Score	Composite Score	Percentile Rank	Conf. Interval (___ %)
Cognitive (Cog)					
			Use Table A.5		
Language (Lang)					
Receptive Communication (RC)					
Expressive Communication (EC)					
Sum					
			Use Table A.4		
Motor (Mot)					
Fine Motor (FM)					
Gross Motor (GM)					
Sum					
			Use Table A.4		
Social-Emotional (SE)					
			Use Table A.5		
Adaptive Behavior					
*Communication (Com)					
Community Use (CU)					
Functional Pre-Academics (FA)					
Home Living (HL)					
*Health and Safety (HS)					
*Leisure (LS)					
*Self-Care (SC)					
*Self-Direction (SD)					
*Social (Soc)					
*Motor (MO)					
Sum					
			(GAC) Use Table A.6		

*For children younger than one year, the GAC is calculated using only those skill areas indicated by an asterisk.

Calculate Age and Start Point

	Years	Months	Days
Date Tested			
Date of Birth			
Age			
Age in Months and Days	Years × 12	+ months	
Adjustment for Prematurity	Adjust through 24 months		
Adjusted Age			
Start Point	Calculate start point according to chart below		

Age	Start Point
16 days–1 month 15 days	A
1 month 16 days–2 months 15 days	B
2 months 16 days–3 months 15 days	C
3 months 16 days–4 months 15 days	D
4 months 16 days–5 months 15 days	E
5 months 16 days–6 months 15 days	F
6 months 16 days–8 months 30 days	G
9 months 0 days–10 months 30 days	H
11 months 0 days–13 months 15 days	I
13 months 16 days–16 months 15 days	J
16 months 16 days–19 months 15 days	K
19 months 16 days–22 months 15 days	L
22 months 16 days–25 months 15 days	M
25 months 16 days–28 months 15 days	N
28 months 16 days–32 months 30 days	O
33 months 0 days–38 months 30 days	P
39 months 0 days–42 months 15 days	Q

PEARSON

Copyright © 2006, 1993, 1984, 1969 by NCS Pearson, Inc.
All rights reserved. Printed in the United States of America.

9 10 11 12 A B C D E

PsychCorp

ISBN 015402723-5



9 780154 027238

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Comitê de Ética em Pesquisa



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Seu(ua) filho(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa intitulada: **“Marcadores inflamatórios, cortisol e desenvolvimento infantil em bebês com sobrepeso e obesidade aos seis e doze meses de idade”**, em virtude da realização de uma pesquisa, coordenada pela Professora Ana Cristina Resende Camargos, e contará ainda com os pesquisadores Ana Cristina Rodrigues Lacerda, Vanessa Amaral Mendonça, Cláudio Heitor Balthazar, Elizabethe Adriana Esteves, Etel Rocha Vieira e da aluna Camila Alves de Andrade.

A sua participação não é obrigatória sendo que, a qualquer momento da pesquisa, você poderá desistir e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo para sua relação com o pesquisador, com a UFVJM ou com a Secretaria Municipal de Saúde.

Os objetivos desta pesquisa são: avaliar e comparar as concentrações de algumas substâncias na saliva e o desenvolvimento infantil entre bebês com peso normal, sobrepeso e obesidade aos seis meses e doze meses de idade. Caso você decida aceitar o convite, o seu bebê será submetido aos seguintes procedimentos: responder a uma ficha de dados sobre o crescimento e condições de saúde do seu bebê e sobre o nível socioeconômico familiar. Além disso, será avaliado o peso, o comprimento, o índice de massa corporal, a história alimentar, o desenvolvimento cognitivo, o desenvolvimento motor e as concentrações de algumas substâncias na saliva do seu bebê. Aos doze meses de idade será coletado também 10 ml de sangue para análise de algumas substâncias. O tempo previsto para a participação do seu bebê é de aproximadamente dois dias aos seis meses de idade e três dias aos doze meses de idade. Será também solicitado que você preencha um diário sobre a alimentação do seu bebê uma vez por mês, entre o sexto e o décimo segundo mês de vida do seu bebê.

Todo o material biológico coletado do seu bebê que não for utilizado para essa pesquisa será descartado. Exemplos desses materiais são a saliva e o sangue.

Os riscos relacionados com sua participação são desconforto e cansaço dos bebês durante a avaliação do desenvolvimento infantil. No entanto, nessa avaliação serão observados comportamentos habituais do bebê e caso esses apresentem algum desconforto, os pesquisadores poderão interromper os testes até que os mesmos se acalmem. Durante a realização da coleta de sangue poderá apresentar dor e hematoma. Para minimizar essas questões, o exame será realizado por profissionais experientes e treinados para coleta de sangue em bebês.

Os benefícios relacionados com a sua participação poderão ser a identificação precoce de obesidade infantil, identificação de marcadores que possam prever complicações de saúde ao longo da vida, bem como identificação de atraso do desenvolvimento infantil. Além disso, todos os pais serão informados a respeito do crescimento e desenvolvimento de seu filho, bem como possíveis doenças do sangue tais como anemias, infecções e outras. Caso

sejam identificadas alterações, os bebês serão encaminhados para as Clínicas de Nutrição, Fisioterapia e Odontologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Caso necessário, os bebês também serão encaminhados para consulta médica.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em seminários, congressos e similares, entretanto, os dados/informações obtidos por meio da sua participação serão confidenciais e sigilosos, não possibilitando sua identificação. A sua participação bem como a de todas as partes envolvidas será voluntária, não havendo remuneração para tal. Qualquer gasto financeiro da sua parte será ressarcido pelo responsável pela pesquisa. Não está previsto indenização por sua participação, mas em qualquer momento se seu bebê sofrer algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, terá direito à indenização.

Você receberá uma cópia deste termo onde constam o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sobre sua participação agora ou em qualquer momento.

Coordenadora do Projeto: Ana Cristina Resende Camargos

Endereço: Rua Grupiara, 147 A, Vila dos Garimpeiros, Diamantina

Telefone: (38) 9823-4665 / (38) 3532-1239

Declaro que entendi os objetivos, a forma de minha participação, riscos e benefícios da mesma e aceito o convite para participar. Autorizo a publicação dos resultados da pesquisa, a qual garante o anonimato e o sigilo referente à minha participação.

Nome do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura do sujeito da pesquisa: _____



Informações – Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM

Rodovia MGT 367 - Km 583 - nº 5000 - Alto da Jacuba –

Diamantina/MG CEP39100000

Tel.: (38)3532-1240 –

Coordenadora: Prof^a. Agnes Maria Gomes Murta

Secretaria: Dione de Paula

Email: cep.secretaria@ufvjm.edu.br e/ou cep@ufvjm.edu.br.

APÊNDICE B – FICHA DE DADOS

Nome: _____

Idade: _____ Data de nascimento: _____

Sexo: _____ Cor da pele: _____

Nome da mãe: _____

Data de Nascimento da Mãe: _____ Idade: _____

Nome do pai: _____

Data de Nascimento do pai: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Telefones: _____

História da gestação e parto:

Peso adquirido pela mãe durante a gestação _____ Altura da mãe: _____

Mãe tabagista durante a gestação: () Sim () Não

Diabetes antes da gestação: () Sim () Não Diabetes gestacional: () Sim () Não

Intercorrência durante a gestação: _____

Tipo de parto: _____

Intercorrência durante o parto: _____

Dados do nascimento:

Idade gestacional: _____ Peso ao nascimento: _____

Comprimento ao nascimento: _____ Perímetro cefálico: _____

APGAR: _____ Primeiro filho(a): () Sim () Não

História familiar:

Mãe obesa: () Sim () Não

Pai obeso: () Sim () Não

Irmãos obesos: () Sim () Não

Quantidade: _____

Crescimento e desenvolvimento no primeiro ano de vida:

Peso atual: _____ Comprimento: _____

IMC: _____ Classificação: _____

Calendário de vacinação em dia: () Sim () Não Data da última vacina: _____

Já apresentou alguma doença: () Sim () Não Quais: _____

Data da última doença: _____

Precisou ficar internado: () Sim () Não

Utiliza algum medicamento: () Sim () Não Quais: _____

Utiliza vitaminas: () Sim () Não Quais: _____

Tipo de alimentação do bebê: _____

Amamentação exclusiva: () Sim () Não Até qual idade: _____

Amamentação predominante, com uso de leite artificial: () Sim () Não

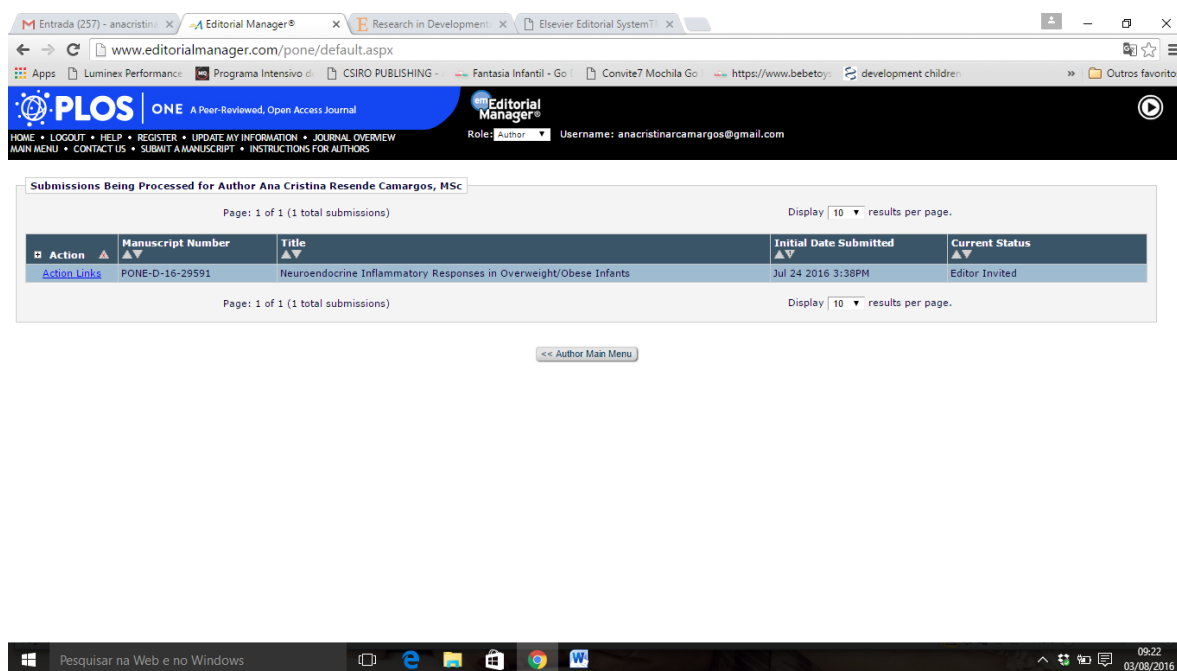
Desde qual idade: _____

Alimentação artificial: () Sim () Não Desde qual idade: _____

APÊNDICE C – ARTIGO 1

Artigo submetido à revista: PLOS ONE

Fator de impacto: 3.234 Qualis Ciências Biológicas II: A2



NEUROENDOCRINE INFLAMMATORY RESPONSES IN OVERWEIGHT/OBESE INFANTS

Short title: Neuroendocrine inflammatory responses in overweight/obese infants

Ana Cristina Resende Camargos^{1,2¶*}, Vanessa Amaral Mendonça^{1,2¶}, Camila Alves de Andrade^{1&}, Katherine Simone Caires Oliveira^{1&}, Rosalina Tossige Gomes^{2&}, Etel Rocha-Vieira^{2&}, Camila Danielle Cunha Neves^{2&}, Erica Leandro Marciano Vieira^{3&}, Hércules Ribeiro Leite^{1,2&}, Murilo Xavier Oliveira^{1&}, Antônio Lúcio Teixeira Júnior^{3&}, Cândido Celso Coimbra^{4&}, Ana Cristina Rodrigues Lacerda^{1,2¶}.

¹Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

²Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia, Diamantina, Brazil.

³Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: anacristinarcamargos@gmail.com

[¶]These authors contributed equally to this work.

[&]These authors also contributed equally to this work.

Abstract

Childhood obesity is related to a cascade of neuroendocrine inflammatory changes. However, there remains a gap in the current literature regarding the possible occurrence of these changes in overweight/obese infants. The objective of this study was to evaluate adipokines, cortisol, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and redox status in overweight/obese infants versus normal-weight peers. A cross-sectional study was conducted with 50 infants (25 in the overweight/obese group and 25 in the normal-weight group) between 6 and 24 months. Plasma levels of leptin, adiponectin, resistin, soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors, chemokines, BDNF, serum cortisol and redox status were measured. Unpaired Student's t-test was used to analyze the results and a probability of $p < 0.05$ was acceptable for rejection of the null hypothesis. The Pearson correlation was used to verify the association between the biomarkers analyzed in each group. Plasma levels of leptin ($p = 0.0001$), adiponectin ($p = 0.0007$) and BDNF ($p = 0.003$), and serum cortisol ($p = 0.048$) were significantly higher in overweight/obese infants than normal-weight infants. In contrast, the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ($p = 0.004$), and catalase ($p = 0.045$) and superoxide dismutase activity ($p = 0.02$) were lower in overweight/obese infants than normal-weight peers. All the results together indicate neuroendocrine inflammatory response changes in overweight/obese infants between 6 and 24 months. Although there is already an environment that predisposes for a subsequent pro-inflammatory response, neuroendocrine secretion changes that permit the control of the inflammatory process in this age interval can be observed.

Introduction

Obesity is defined as a long-term positive caloric imbalance leading to adipose tissue expansion, which may occur via increases in adipocyte size (hypertrophy), number (hyperplasia) or both [1,2]. Obese individuals presented a chronic low-grade inflammation that involves excessive adipocyte hypertrophy, immune cell infiltration, extracellular matrix overproduction, increased production of pro-inflammatory adipokines and redox imbalance [3,4,5].

The obesity and overweight dysfunctional adipose tissue releases chemokines that attract circulating monocytes and other leukocyte subsets to infiltrate adipose tissue, contributing to the altered adipokine secretion pattern [3,4,6]. As a result, pro-inflammatory cytokines, such as the tumor necrosis factor (TNF), considered to be a major macrophage-derived paracrine mediator of inflammation in the adipose tissue, are overproduced [3,4]. Higher levels of soluble TNF receptors, resistin and leptin, as well as lower levels of adiponectin are related to inflammation, insulin resistance and cardiovascular diseases [7,8].

Hypertrophic adipose tissue growth is associated with adipose tissue inflammation [2]. Therefore, an increase in pro-inflammatory adipokines secreted by infiltrated macrophages and hypertrophied adipocytes, as well as an elevated production of reactive oxygen species (ROS), can decrease the differentiation capacity of preadipocytes and inhibit adipogenesis [4,5,9,10]. On the other hand, the current literature has demonstrated that hyperplastic growth, generating healthy, functional, smaller adipocytes, maintains the functioning of healthy adipose tissue through enhanced recruitment of adipocyte precursor cells that are differentiated into small adipocytes, with minimal inflammation and redox imbalance [1,9]. Thus, higher levels of adiponectin, an anti-inflammatory adipokine, can inhibit pro-inflammatory effects and can help to maintain equilibrium adipocyte, size-accelerating adipogenesis [5,11,12]. Moreover, other endocrine and autocrine factors can mediate the equilibrium adipocyte size, interfering in the synthesis and activity of adipogenic transcription factors as hormones and growth factors. Among these, cortisol is considered to be an important hormone inducer of adipogenesis [13], and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a regulatory role in human adipocyte differentiation [14]. Childhood obesity is a serious problem of public health, and the prevalence is increasing in very young children, including infants [15]. Early postnatal weight gain in infancy is associated with overweight and obesity, central adiposity, low-grade systemic inflammation and redox imbalance in later

childhood, predisposing to metabolic derangements and chronic inflammatory diseases like insulin resistance and cardiovascular impairment [16,17,18].

Several studies have demonstrated the dysregulated secretion pattern of these biomarkers in childhood. Higher levels of leptin, resistin, soluble TNF receptors 1 (sTNFR1) and 2 (sTNFR2), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES), interleukin-8 (IL-8), interferon-inducible protein 10 (IP-10), monokine induced by interferon- γ (MIG), ROS and cortisol, as well as lower levels of adiponectin, BDNF and antioxidant enzymes in school-age overweight or obese children can be observed [8,10,19,20,21,22,23,24,25]. Another study already demonstrated elevated C-reactive protein (CRP) levels, another inflammatory marker, in preschool obese children [26]. Thus, obese children over two years of age present excessive adipocyte hypertrophy and hyperplasia compared to normal-weight children [17,27]. The larger sized adipocytes in childhood obesity already seem able to trigger a cascade of neuroendocrine inflammatory changes to activate a chronic low-grade inflammation state and redox imbalance.

However, no data about inflammatory, hormonal and neurotrophic markers in infants up to the age of 2 years exists. There is a gap in the current literature regarding the possible occurrence of these changes in overweight and obese infants. Considering that infancy is a period of accelerated accumulation of adipose tissue mass [17,27], it is important to verify whether the expansion of adipose tissue promotes all these changes in this age group.

The objective of this study was to evaluate the plasmatic levels of adipokines [leptin, adiponectin, resistin, sTNFR1, sTNFR2 and chemokines (MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 and MIG)] and BDNF, serum cortisol and redox status in overweight/obese infants versus normal-weight peers matched for gender, age, socioeconomic status, maternal education, exclusive breastfeeding until 6 months, and the use of vitamin supplements. It is believed that there can already be changes in the secretion of neuroendocrine inflammatory parameters in overweight/obese children in this early stage of infant development. These changes: 1). contribute to the low-grade inflammation and oxidative stress in childhood; or 2). promote balance towards controlling or inhibiting the low-grade inflammatory status and oxidative stress in infancy.

Materials and methods

Study design and subjects

A cross-sectional study was conducted with infants between 6 and 24 months enrolled in Family Health Strategies in the city of Diamantina, Minas Gerais, Brazil. The overweight/obese group included infants with body mass index (BMI) \geq 97th percentile (z score $> +2$). For each overweight/obese infant, a normal-weight peer (BMI ≥ 3 and < 85 th percentile: z score > -2 and $< +1$) was selected to match for gender, age, socioeconomic status, maternal education, exclusive breastfeeding until 6 months and use of vitamin supplements. These participants were classified on the basis of World Health Organization (WHO) BMI-for-age cut-off points relative to age and gender [28]. Exclusion criteria were as follows: preterm infants; infants with signs of malnutrition or illness that interfere with growth and development; infants who had some infectious process (fever, influenza, diarrhea, ear infections, etc.) or who were vaccinated in the past 15 days, and infants using any medication. This study was approved by the Scientific Ethics Committee of the Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (protocol n^o. 085/12).

Assessment of BMI and infant data

BMI was calculated on the basis of body weight and body length measurements. A pediatric electronic scale (Welmy, São Paulo, Brazil) with a 15-kg capacity and an accuracy of 5 g was used to weigh the infants. A portable infant stadiometer (Seca, Hamburgo, Germany) with millimeter resolution was used to measure infant length. These measurements were performed by the same, properly trained examiner. The WHO Anthro software version 3.2.2 (Geneva, Switzerland) was used to calculate BMI-for-age, expressed as z-scores [29].

The parents answered questions about exclusive breastfeeding time, use of vitamin supplement and infant health data. The Brazilian Criteria of Economic Classification, developed by the Brazilian Association of Research Companies, was used to assess the socioeconomic status of families. Classes were grouped into A, B, C, D and E, in which A indicates the highest economic class and E the lowest economic class [30].

Measurements of plasma adipokines, BDNF and serum cortisol

Twenty-four hours after the initial assessment, six milliliters of each of the blood samples was collected in a local laboratory following 3 hours of fasting in the morning. The tubes (sodium heparin and serum) were centrifuged to remove cells and debris and were stored as plasma, serum and erythrocytes aliquots at -80°C until use.

Plasma leptin, adiponectin, resistin, BDNF and soluble TNF receptor (sTNFR1, sTNFR2) levels were measured using conventional sandwich ELISA kits (DuoSet, R&D

Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The detection limits were 5.0 pg/mL for all the kits.

Plasma chemokines (CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 and CXCL9/MIG) were measured using the cytometric bead arrays kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Bead flow cytometry allows the simultaneous quantification of various proteins in the same test. Samples were acquired in a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using the FCAP Array v1.0.1 software (Soft Flow Inc.). The detection limits were 0.2 pg/mL for IL-8, 1.0 pg/mL for RANTES, 0.2 pg/mL for MIG, 2.7 pg/mL for MCP-1 and 2.8 pg/mL for IP-10.

Serum cortisol was measured using competitive ELISA kit (IBL, AMERICA, Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's instructions. The detection limits were 55.2 nmol/L.

Measurements of redox status

The redox status was assessed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration, antioxidants enzymes dismutase superoxide (SOD) and catalase (CAT) activity, as well by ferric reducing antioxidant power (FRAP) in the erythrocyte lysate. The erythrocyte lysate was prepared as described by Glass and Gershon [31]. Protein concentration of samples was determined by the Bradford method [32] using bovine serum albumin (BSA) (1 mg/mL) as standard.

TBARS concentration was measured according to the method described by Ohkawa et al. [33], and the reaction of the thiobarbituric acid with malondialdehyde (MDA) was used to determine lipid peroxidation. TBARS concentration, expressed in nmol MDA/mg protein, was determined from the standard curve constructed with known concentrations of MDA (1,1,3,3-tetramethoxypropane) (Sigma, USA). The assay to determine SOD (EC 1.15.1.1) activity was performed according to Srivastava et al. [34] and expressed in U/mg of protein. SOD activity was determined by measuring the capacity of SOD to inhibit the autoxidation of pyrogallol. CAT (EC 1.11.1.6) activity was measured according to the method of Nelson and Kiesov [35] and expressed by $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ protein, where ΔE represents the variation in enzyme activity during 1 minute. The total antioxidant capacity (FRAP) was determined according to the method of Benzie and Strain [36], which is based on the reduction of ferric-tripyridyltriazine [Fe(III)-TPTZ] complex to ferrous-tripyridyltriazine [Fe(II)-TPTZ]. The total antioxidant capacity was expressed as equivalents of Fe^{2+} , estimated by comparison with

a standard curve constructed with known concentrations of FeSO_4 and expressed as $\mu\text{g FeSO}_4/\text{mg}$ of protein.

Statistical analyses

The data were analyzed using the SPSS statistical package, version 17.0 (Inc., USA) and GraphPad Prism, version 5.0 (Inc., USA). The Chi-square test or Fisher's exact test were utilized to compare the proportions of the two groups. The Shapiro-Wilk and Levene test were applied to evaluate the normality and homogeneity of results, respectively. Log-transformations were used to normalize the BDNF, MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10, MIG, sTNFR1, sTNFR2, TBARS, CAT, SOD and FRAP data. The Student's unpaired t-test was performed to compare the groups, and the Pearson correlation was used to verify the association between the biomarkers analyzed in each group. The significance level was 5% ($\alpha < 0.05$).

A sample size of 50 participants (25 in the overweight/obese group and 25 in the normal-weight group) was required to test a minimum 0.34 effect size with a power equal to 90% and a two-tailed α -value = 0.05 for the leptin, adiponectin, BDNF, sTNFR1, sTNFR2, MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 and MIG variables. At least 20 participants in each group was required for the test with cortisol, and at least 18 participants in each group was required for the TBARS, CAT, SOD and FRAP variables to obtain a power equal to 90% and a two-tailed α -value = 0.05.

Results

Characteristics of study participants

The groups were similar in gender, economic status, maternal education, exclusive breastfeeding until 6 months, use of vitamin supplements, age and body length. Body weight and BMI values were significantly higher in the overweight/obese group (Table 1) than in the normal-weight group.

Plasma and serum biomarkers levels

Plasma levels of leptin ($p=0.0001$; 95% CI: -1164, -404.6), adiponectin ($p=0.0007$; 95% CI: -6289, -1810) and log BDNF ($p=0.003$; 95% CI: -0.37, -0.08) were significantly higher in overweight/obese infants than in normal-weight peers. Serum cortisol also presented higher levels in overweight/obese infants ($p=0.048$; 95% CI: -136.4, -0.47). However, there

was no significant difference between the two groups in mean values of plasma resistin ($p=0.90$; 95% CI: -299.4, 263.3) (Fig 1).

Soluble receptors of TNF (sTNFR1 ($p=0.92$; 95% CI: -0.08, 0.07) and sTNFR2 ($p=0.32$; 95% CI: -0.03, 0.09)) and chemokines [MCP-1 ($p=0.13$; 95% CI: -0.04, 0.27), RANTES ($p=0.06$; 95% CI: -0.26, 0.01), IL-8 ($p=0.79$; 95% CI: -0.14, 0.18), IP-10 ($p=0.06$; 95% CI: -0.31, 0.01) and MIG ($p=0.27$; 95% CI: -0.40, 0.12)] log plasma levels did not differ significantly between the groups (Fig 2).

Redox status

With regard to redox status, significant differences were found in TBARS concentrations ($p=0.004$; 95% CI: 0.10, 0.49) and CAT ($p=0.045$; 95% CI: 0.003, 0.34) and SOD ($p=0.02$; 95% CI: 0.03, 0.41) activity. The levels for the overweight/obese group were lower than those of their normal-weight peers. No found significant difference in mean values of FRAP ($p=0.59$; 95% CI: -0.21, 0.36) (Fig 3) was found between the two groups.

Correlation between biomarkers analyzed

In overweight/obese infants, the adiponectin plasma levels were inversely associated with leptin ($p=0.02$; $r=-0.61$), sTNFR1 ($p=0.03$; $r=-0.45$) and IL8 ($p=0.008$; $r=-0.53$). There was also a negative association of cortisol with sTNFR1 ($p=0.04$; $r=-0.44$) and MCP-1 ($p=0.02$; $r=-0.49$). BDNF was positively associated with sTNFR1 ($p=0.03$; $r=0.43$), MCP-1 ($p=0.03$; $r=0.44$), IL-8 ($p=0.009$; $r=0.52$) and IP-10 ($p=0.04$; $r=0.42$). Positive associations between multiple biomarkers with pro-inflammatory roles were also demonstrated: leptin and sTNFR1 ($p=0.02$; $r=0.46$); resistin and sTNFR2 ($p=0.03$; $r=0.43$); sTNFR1 and sTNFR2 ($p=0.007$; $r=0.52$); sTNFR2 and IP-10 ($p=0.02$; $r=0.46$); IL8 and RANTES ($p=0.04$; $r=0.41$); MIG and RANTES ($p=0.01$; $r=0.50$); MIG and IL-8 ($p=0.007$; $r=0.54$) and; IP-10 and MIG ($p=0.0001$; $r=0.83$). Finally, TBARS were positively associated with SOD ($p=0.04$; $r=0.52$) and CAT ($p=0.03$; $r=0.54$) activity; and the antioxidant defense was also positively associated [CAT and SOD ($p = 0.0001$; $r=0.84$); SOD and FRAP ($p=0.0001$; $r=0.83$); CAT and FRAP ($p=0.0001$; $r=0.82$)].

Positive associations between plasma levels of pro-inflammatory biomarkers were observed in the normal weight group: resistin and IP-10 ($p=0.02$; $r=0.59$); resistin and MIG ($p=0.03$; $r=0.46$); sTNFR1 and sTNFR2 ($p=0.0001$; $r=0.67$); sTNFR1 and IP-10 ($p=0.01$; $r=0.51$); sTNFR1 and MIG ($p=0.02$; $r=0.47$); sTNFR2 and MIG ($p=0.007$; $r=0.53$); IL-8 and MIG ($p=0.002$; $r=0.60$); IP-10 and MIG ($p=0.02$; $r=0.48$). A positive association of TBARS

with the activity of SOD ($p=0.0001$; $r=0.85$) and CAT ($p=0.02$; $r=0.67$) was demonstrated. The activities of SOD and CAT enzymes also had a positive association with each other ($p=0.04$; $r=0.53$). CAT was also had positive associated with FRAP ($p=0.03$; $r=0.58$). Finally, A positive association of FRAP with BDNF ($p=0.03$; $r=0.56$) was observed

Discussion

This study showed that overweight or obese infants between 6 and 24 months presented higher levels of leptin, adiponectin, BDNF, cortisol and lower levels of TBARS, CAT and SOD activity than those of their normal-weight peers. There were no differences in the levels of resistin, soluble TNF- α receptors, chemokines and FRAP between the groups. As far as it is known, this is the first study that evaluated all these biomarkers in infancy. These results indicate neuroendocrine inflammatory response changes in overweight/obese infants. Moreover, it is possible to show that neuroendocrine secretion changes occur to control the inflammatory process in this age interval.

The increase in plasma leptin levels found in this study was expected in overweight/obese infants that presented a higher body weight and BMI than normal-weight peers. Leptin is an adipokine that acts by signaling body fat stores to the hypothalamus, which, in turn, regulates food intake and energy expenditure to maintain body weight homeostasis [37]. Higher circulating concentrations of leptin may inhibit enlargement of fat depot size and influence the number of cells present through the inhibition of preadipocyte proliferation or reduction in adipocyte size [38]. However, elevated levels of leptin may induces monocyte activation, cytokine production and redox imbalance [5]. In the present study, the leptin levels were positively associated with sTNFR1 levels and negatively associated with adiponectin levels in overweight/obese infants, showing that the increase in plasma leptin levels can create an environment that predisposes to a subsequent pro-inflammatory response.

The plasma levels of adiponectin were also high in the overweight/obese group. This result is different from that of other studies that found lower circulating adiponectin levels in school-aged obese children [20,39]. However, adiponectin is not only related to the amount of body fat, but also the maturational stage of the adipose tissue [40]. Adiponectin levels are high at birth, they are positively correlated with adiposity in neonatal period [41], and they decreased longitudinally with increasing age and adiposity in childhood and adulthood [42]. These elevated levels of adiponectin in infancy can help to protect overweight/obese infants against several diseases, because adiponectin has anti-inflammatory and anti-atherogenic

effects and augments insulin sensitivity, thereby protecting against obesity-related cardiovascular and metabolic diseases [11,12,43]. In the present study, plasma adiponectin levels were inversely associated with the plasma pro-inflammatory biomarkers - leptin, sTNFR1 and IL8 levels - in the overweight/obese group. This fact reinforces the suggestion that adiponectin exerts a possible anti-inflammatory protective effect.

In addition to adiponectin, cortisol was also present in high concentrations in overweight/obese infants. Cortisol can tune inflammatory responses by suppressing immune or inflammatory genes [6,13]. Serum cortisol levels also showed a negative association with sTNFR1 and MCP-1 levels in the overweight/obese group. Cortisol could reduce chemokine expression, macrophage recruitment and decrease adipose tissue macrophage accumulation [44]. In addition, adiponectin functions as a direct regulator of the macrophage phenotype and favors the switch from a pro-inflammatory state (M1) to an anti-inflammatory state (M2) that secretes anti-inflammatory cytokines while it down-regulates the production of pro-inflammatory cytokines, chemokines and ROS [5,6,12,43].

Thus, higher plasma adiponectin and serum cortisol levels may have impeded the increase in plasma pro-inflammatory markers like sTNFR1, MCP-1 and IL-8 in the overweight/obese infants. sTNFR1 is a dominant mediator of the TNF function [45] and the principal paracrine mediator of inflammation in the adipose tissue [3,4]. MCP-1 is considered to be pivotal for recruitment of circulating monocytes into adipose tissue that is switching to the pro-inflammatory state M1 macrophage [44] and IL-8 are involved in the recruitment of monocytes and other immune cells into adipose tissue [4,12]. In this study, no differences were found between the groups with respect to these plasma level biomarkers and resistin, sTNFR2, RANTES, IP-10 and MIG. Despite the fact that the current literature highlights the higher pro-inflammatory biomarkers in school-aged obese children [17,19,23,46], it appears that the low-grade inflammatory state has not yet been triggered in overweight/obese infants. Although evidence of increased levels of leptin, a pro-inflammatory adipokine, in overweight/obese infants has been observed, it is noteworthy that these findings seem to indicate that elevated levels of adiponectin and cortisol could contribute to the control of the low-grade inflammatory state.

Overweight/obese infants still exhibit higher concentrations of BDNF. Together with leptin, BDNF is also involved in regulatory hypothalamic pathways essential for control of body weight and energy homeostasis [47,48]. However, the levels of these biomarkers were not associated in the present study. In this study, plasma BDNF levels were positively associated with the plasma levels of sTNFR1, MCP-1, IL-8 and IP-10. BDNF is present at

high levels in infancy and is expressed throughout the developing and mature central nervous system and in many peripheral tissues, including adipose tissue [49]. BDNF is thought to have a crucial role in modulating neuroinflammation by promoting neuroprotection because high levels can increase neuronal resistance to metabolic stress [47].

Overweight/obese infants presented lower TBARS levels and lower activities of antioxidant enzymes SOD and CAT. Studies show that adipocyte dysfunction resulting from excess body fat increases the production of ROS, which can damage cell membranes by a process called lipid peroxidation. This reaction leads to the formation of MDA, as is indicated by the elevated levels of TBARS in overweight or obese children [16,50]. However, the result of the biomarker of lipid peroxidation (TBARS) in this study was distinct from the evidence presented in the literature for school-aged children [16,22], and the reason for this difference is not completely understood. The lower SOD and CAT activities was similar to those of other studies, which demonstrated the presence of a low antioxidant defense in overweight and obese children [16]. The lower concentration of TBARS may have reduced the activities of antioxidant enzymes SOD and CAT because their production is stimulus-dependent. This association was demonstrated in the present study in both groups. In addition, the total antioxidant capacity, composed of endogenous and exogenous antioxidants, was not different between the groups. The overweight/obese infants seem to have a lower degree of lipid peroxidation and antioxidant defense than normal-weight infants. This fact instigates new studies to verify the possible causes of these findings.

Considering the biology and development of adipose tissue, the large secretion pattern of adiponectin and cortisol is related to the differentiation and proliferation of adipocytes [13,18,51]. In addition, BDNF also has a potential role as a regulator of human adipocyte differentiation [14]. Therefore, the high levels of adiponectin, cortisol and BDNF found in overweight/obese infants of this study suggest that the expansion of adipose tissue is associated with a large increase in the number of adipocytes at this age interval. Adipose tissue rapidly expands in infancy as a result of increased size and number of adipocytes, and it is mainly composed of small, newly differentiated adipocytes [51]. According to Laudes [52], first excess energy is stored as additional triglycerides in existing adipocytes and results in an enlargement of these cells, which is called hypertrophy. Secondly, if the number of fat cells is not sufficient to store increasing amounts of triglycerides, new adipocytes are generated by adipogenesis in a process described as hyperplasia. A classical study showed that in normal-weight infants between 6 and 12 months of age, fat depots primarily increase in cell size, with only minor contributions by the number of cells. After 12 months, a decrease in cell size was

observed in normal-weight infants, and they displayed small increments in cell number until the age of 24 months, thereby demonstrating that this period is important for hypercellularity of adipose tissue [27]. However, no data were found regarding the expansion of adipose tissue in overweight or obese children until the age of 24 months, and a gap in the literature regarding this question remained. Although this study did not evaluate samples of adipose tissue that could confirm a possible expansion of adipose tissue in overweight/obese infants, these results lead us to believe that this expansion seems to have occurred through a balance of hypertrophy and hyperplasia, and a marked hypercellularity of adipose tissue.

The early hypercellularity in obese children is considered to be the strongest predictor of adipose tissue mass in childhood [17]. This fact recalls the earlier concept of a “hyperplastic” model of obesity in children versus a “hypertrophic” model in adults [53]. In the “hyperplastic” model, healthy adipose expansion with differentiation into small adipocytes and the presence of M2-like macrophages that help to maintain tissue homeostasis and preserve cellular functionality occurs [6,9,54]. In contrast, in the “hypertrophic” model, pathological adipose expansion consists of a massive enlargement of existing adipocytes, and M1-like macrophages prevail, leading to an inflammatory phenotype [54].

Finally, the dynamic secretions of adipokines, cortisol, and BDNF seem to be having different functions throughout growth and development during infancy, childhood and adulthood [40,53]. Therefore, it is important to note that, in spite of the fact that the early increase in levels of cortisol and adiponectin may partially protect against of low-grade inflammatory state in infancy, the long-term effect can predispose to other metabolic complications. Moreover, long-term elevated levels of leptin promote leptin resistance, leading to energy balance dysregulation and inducing a redox imbalance [5]. Chronic excess of cortisol produces increased body fat and promotes redistribution of human adipocytes from peripheral to central depots and an accumulation of visceral fat and abdominal obesity [13,18,44], that are related to cardiovascular risk factors, insulin resistance and development of the metabolic syndrome in obese children and adolescents [18,24]. Chronic elevated cortisol levels and leptin resistance can still explain the lower secretion of BDNF found in morbidly obese children and children with metabolic syndrome [25,48], and they are associated with deficits in cognition and synaptic plasticity [55]. Considering that adiponectin decreases longitudinally in childhood [39] and low adiponectin levels are predictive of the accumulation of cardiovascular risk factors and metabolic syndrome in obese school children [20], there is a long-term reduction in its protective role. Thus, it is possible that early

modifications may contribute to the chronic low-grade inflammation and redox imbalance in childhood or adulthood.

It is still important to consider that some factors that could have affected the results of this study were controlled by matching between groups. Breastfeeding should be considered because several adipokines, cortisol and antioxidants have been identified in human breast milk [56,57]. The use of vitamin supplements for some infants, prescribed by pediatricians, also has influenced the results of the total antioxidant capacity [50]. Furthermore, economic status could affect cortisol levels [58].

This study also had some limitations. First, BMI was used to classify the groups, and a more comprehensive examination of body composition would have been of great value to this study and should be considered in future studies in infants. Secondly, it was not possible to control the dietary patterns and certain nutritional factors that can modify the secretion of adipokines [59] and antioxidant capacity [50]. Finally, a cross-sectional study was conducted, and it is important that further longitudinal studies be performed to clarify when other inflammatory changes are triggered.

Conclusion

This is the first study that showed higher levels of leptin, adiponectin, BDNF, cortisol and lower levels of TBARS, SOD and CAT activities in overweight/obese infants when compared with their normal-weight peers. All these results point out neuroendocrine inflammatory response changes in overweight/obese infants between 6 and 24 months. Although there is already an environment that predisposes to a subsequent pro-inflammatory response, it is possible to demonstrate that neuroendocrine secretion changes occur to permit the control of the inflammatory process control in this age interval.

Acknowledgments

We thank the Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri for institutional support, the CNPq, FAPEMIG, and CAPES for financial support and scholarships. The authors are in debt to David Lee Nelson for kindly reading the manuscript.

References

1. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisém J, et al. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010; 59(1):105-9. doi: [10.2337/db09-0942](https://doi.org/10.2337/db09-0942) PMID: [19846802](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846802/)

2. Molgat AS, Gagnon A, Foster C, Sorisky A. The activation state of macrophages alters their ability to suppress preadipocyte apoptosis. *J Endocrinol.* 2012; 214(1):21-9. doi: [10.1530/JOE-12-0114](https://doi.org/10.1530/JOE-12-0114) PMID: [22556272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22556272/)
3. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes role of free fatty acids and tumor necrosis factor α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(10):2062-8. doi: [10.1161/01.ATV.0000183883.72263.13](https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000183883.72263.13) PMID: [16123319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16123319/)
4. Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology.* 2007; 148(2):868-77. doi: [10.1210/en.2006-0687](https://doi.org/10.1210/en.2006-0687) PMID: [17082259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17082259/)
5. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; 115(5):911-9. doi: [10.1016/j.jaci.2005.02.023](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.02.023) PMID: [15867843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15867843/)
6. Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol.* 2010; 32(7):307-14. doi: [10.1016/j.it.2011.04.008](https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.008) PMID: [21616718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21616718/)
7. Adamska A, Nikolajuk A, Karczewska-Kupczewska M, Kowalska I, Otziomek E, Górka M, et al. Relationships between serum adiponectin and soluble TNF- α receptors and glucose and lipid oxidation in lean and obese subjects. *Acta Diabetol.* 2012; 49(1):17-24. doi: [10.1007/s00592-010-0252-y](https://doi.org/10.1007/s00592-010-0252-y) PMID: [21234613](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21234613/)
8. Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Porcar-Almela M, Navarro-Solera M, Arilla-Codoñer Á, Alonso-Iglesias E. Plasma resistin levels are associated with homocysteine, endothelial activation, and nitrosative stress in obese youths. *Clin Biochem.* 2014; 47(1-2):44-8. doi: [10.1016/j.clinbiochem.2013.10.021](https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.10.021) PMID: [24183883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24183883/)
9. Sorisky A, Molgat AS, Gagnon A. Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go? *Adv Nutr.* 2013; 4(1):67-75. doi: [10.3945/an.112.003020](https://doi.org/10.3945/an.112.003020) PMID: [23319125](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23319125/)
10. Faienza MF, Francavilla R, Goffredo R, Ventura A, Marzano F, Panzarino G, et al. Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Horm Res Paediatr.* 2012; 78(3):158-64. doi: [10.1159/000342642](https://doi.org/10.1159/000342642) PMID: [23052543](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23052543/)
11. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res.* 2005; 46(7):1369-79. doi: [10.1194/jlr.M400373-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M400373-JLR200) PMID: [15834118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15834118/)
12. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M, Wara A, Feinberg MW, Sukhova GK, et al. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages

and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. *Circ Res.* 2008; 102(2):218-25. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.107.164988](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.164988) PMID: [17991878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17991878/)

13. Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(3): 473-81. doi: [10.1016/j.bbadis.2013.05.029](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.029) PMID: [23735216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23735216/)

14. Bernhard F, Landgraf K, Klöting N, Berthold A, Büttner P, Friebe D, et al. Functional relevance of genes implicated by obesity genome-wide association study signals for human adipocyte biology. *Diabetologia.* 2013; 56(2):311-22. doi: [10.1007/s00125-012-2773-0](https://doi.org/10.1007/s00125-012-2773-0) PMID: [23229156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23229156/)

15. Sabin MA, Kao KT, Juonala M, Baur LA, Wake M. Viewpoint article: Childhood obesity—looking back over 50 years to begin to look forward. *J Paediatr Child Health.* 2015; 51(1):82-86. doi: [10.1111/jpc.12819](https://doi.org/10.1111/jpc.12819) PMID: [25586849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25586849/)

16. Zhu YG, Zhang SM, Wang JY, Xiao WQ, Wang XY, ZHOU JF. Overweight and obesity-induced oxidative stress in children. *Biomed Environ Sci.* 2006; 19(5):353-9. PMID: [17190187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17190187/)

17. Landgraf K, Rockstroh D, Wagner IV, Weise S, Tauscher R, Schwartz JT, et al. Evidence of early alterations in adipose tissue biology and function and its association with obesity-related inflammation and insulin resistance in children. *Diabetes.* 2015; 64(4): 1249-61. doi: [10.2337/db14-0744](https://doi.org/10.2337/db14-0744) PMID: [25392242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25392242/)

18. Guzzetti C, Pilia S, Ibba A, Loche S. Correlation between cortisol and components of the metabolic syndrome in obese children and adolescents. *J Endocrinol Invest.* 2014; 37(1):51-6. doi: [10.1007/s40618-013-0014-0](https://doi.org/10.1007/s40618-013-0014-0) PMID: [24464450](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24464450/)

19. Economou EV, Malamitsi-Puchner AV, Pitsavos CP, Kouskouni EE, Magaziotou-Elefsinioti I, Damianaki-Uranou D, et al. Negative association between circulating total homocysteine and proinflammatory chemokines MCP-1 and RANTES in prepubertal lean, but not in obese, children. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44(3):310-5. PMID: [15475827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15475827/)

20. Yoshinaga M, Sameshima K, Tanaka Y, Wada A, Hashiguchi J, Tahara H, et al. Adipokines and the prediction of the accumulation of cardiovascular risk factors or the presence of metabolic syndrome in elementary school children. *Circ J.* 2008; 72(11):1874-8. PMID: [18812676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18812676/)

21. Leoni MC, Valsecchi C, Mantelli M, Marastoni L, Tinelli C, Marchi A, et al. Impact of child obesity on adipose tissue physiology: assessment of adipocytokines and inflammatory cytokines as biomarkers of obesity. *Pediatr Rep.* 2010; 2(2): e19. doi: [10.4081/pr.2010.e19](https://doi.org/10.4081/pr.2010.e19) PMID: [10.4081/pr.2010.e19](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10.4081/pr.2010.e19/)

22. Oliver SR, Rosa JS, Milne GL, Pontello AM, Borntrager HL, Heydari S, et al. Increased oxidative stress and altered substrate metabolism in obese children. *Int J Pediatr Obes*. 2010; 5(5):436-44. doi: [10.3109/17477160903545163](https://doi.org/10.3109/17477160903545163) PMID: [20233149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20233149/)
23. Breslin WL, Johnston CA, Strohacker K, Carpenter KC, Davidson TR, Moreno JP, et al. Obese Mexican American children have elevated MCP-1, TNF- α , monocyte concentration, and dyslipidemia. *Pediatrics*. 2012; 129(5): e1180-86. doi: [10.1542/peds.2011-2477](https://doi.org/10.1542/peds.2011-2477) PMID: [22473371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22473371/)
24. Veldhorst MA, Noppe G, Jongejan MH, Kok CB, Mekic S, Koper JW, et al. Increased scalp hair cortisol concentrations in obese children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(1): 285-90. doi: [10.1210/jc.2013-2924](https://doi.org/10.1210/jc.2013-2924) PMID: [24384019](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24384019/)
25. Araki S, Yamamoto Y, Dobashi K, Asayama K, Kusuhara K. Decreased plasma levels of brain-derived neurotrophic factor and its relationship with obesity and birth weight in obese Japanese children. *Obes Res Clin Pract*. 2014; 8(1):e63-9. doi: [10.1016/j.orcp.2012.07.003](https://doi.org/10.1016/j.orcp.2012.07.003) PMID: [24548578](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24548578/)
26. Skinner AC, Steiner MJ, Henderson FW, Perrin EM. Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. *Pediatrics*. 2010; 125(4):e801-9. doi: [10.1542/peds.2009-2182](https://doi.org/10.1542/peds.2009-2182) PMID: [20194272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20194272/)
27. Knittle J, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown R, Katz D. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest*. 1979; 63(2):239-46. doi: [10.1172/JCI109295](https://doi.org/10.1172/JCI109295) PMID: [429551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/429551/)
28. De Onis M, Lobstein T. Defining obesity risk status in the general childhood population: which cut-offs should we use? *Int J Pediatr Obes* 5(6):458-60. doi: [10.3109/17477161003615583](https://doi.org/10.3109/17477161003615583) PMID: [20233144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20233144/)
29. WHO. Child growth standards: WHO Anthro (version 3.2. 2, January 2011) and macros. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2011. Available from: <http://www.who.int/childgrowth/standards/en>.
30. Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa. Critério de classificação econômica Brasil. Abep São Paulo; 2008. Available from: <http://www.abep.org/criterioBrasil.aspx> (accessed 10 July 2014).
31. Glass GA, Gershon D. Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: loss of superoxide dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981; 103(4):1245-53. PMID: [7332591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7332591/)

32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54. PMID: [942051](#)
33. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2):351-8. PMID: [36810](#)
34. Srivastava S, Chandrasekar B, Gu Y, Luo J, Hamid T, Hill BG, et al. Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to β -adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. *Cardiovasc Res.* 2007; 74(3):445-55. doi: [10.1016/j.cardiores.2007.02.016](#) PMID: [17362897](#)
35. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem.* 1972; 49(2):474-8. PMID: [5082943](#)
36. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1):70-6. doi: [10.1006/abio.1996.0292](#) PMID: [8660627](#)
37. Aprath-Husmann I, Röhrig K, Gottschling-Zeller H, Skurk T, Scriba D, Birgel M, et al. Effects of leptin on the differentiation and metabolism of human adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25(10):1465-70. doi: [10.1038/sj.ijo.0801737](#) PMID: [11673767](#)
38. Harris RB. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(3):414-23. doi: [10.1016/j.bbadis.2013.05.009](#) PMID: [23685313](#)
39. Li S, Liu R, Arguelles L, Wang G, Zhang J, Shen X, et al. Adiposity trajectory and its associations with plasma adipokine levels in children and adolescents - A prospective cohort study. *Obesity (Silver Spring).* 2016; 24(2):408-16. doi: [10.1002/oby.21378](#) PMID: [26704698](#)
40. Martos-Moreno GÁ, Barrios V, Martínez G, Hawkins F, Argente J. Effect of Weight Loss on High-Molecular Weight Adiponectin in Obese Children. *Obesity (Silver Spring).* 2010; 18(12):2288-94. doi: [10.1038/oby.2010.68](#) PMID: [20339359](#)
41. Kotani Y, Yokota I, Kitamura S, Matsuda J, Naito E, Kuroda Y. Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004; 61(4):418-23. doi: [10.1111/j.1365-2265.2004.02041.x](#) PMID: [15473872](#)
42. Jeffery AN, Murphy MJ, Metcalf BS, Hosking J, Voss LD, English P, et al. Adiponectin in childhood. *Int J Pediatr Obes.* 2008; 3(3):130-140. doi: [10.1080/17477160801954538](#) PMID: [19086185](#)

43. Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, et al. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem*. 2010; 285(9):6153-60. doi: [10.1074/jbc.M109.088708](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.088708) PMID: [20028977](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20028977/)
44. Patsouris D, Neels JG, Fan W, Li PP, Nguyen MA, Olefsky JM. Glucocorticoids and thiazolidinediones interfere with adipocyte-mediated macrophage chemotaxis and recruitment. *J Biol Chem*. 2009; 284(45):31223-35. doi: [10.1074/jbc.M109.041665](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041665) PMID: [19740750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19740750/)
45. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS lett*. 2008; 582(1):117-31. doi: [10.1016/j.febslet.2007.11.051](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.051) PMID: [18037376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18037376/)
46. Zhang M, Zhao X, Li M, Cheng H, Hou D, Wen Y, et al. Abnormal adipokines associated with various types of obesity in Chinese children and adolescents. *Biomed Environ Sci*. 2011; 24(1):12-21. doi: [10.3967/0895-3988.2011.01.002](https://doi.org/10.3967/0895-3988.2011.01.002) PMID: [21440835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21440835/)
47. Rosas-Vargas H, Martínez-Ezquerro JD, Bienvenu T. Brain-derived neurotrophic factor, food intake regulation, and obesity. *Arch Med Res*. 2011; 42(6):482-94. doi: [10.1016/j.arcmed.2011.09.005](https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2011.09.005) PMID: [21945389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945389/)
48. Roth CL, Elfers C, Gebhardt U, Müller HL, Reinehr T. Brain-derived neurotrophic factor and its relation to leptin in obese children before and after weight loss. *Metabolism*. 2013; 62(2):226-34. doi: [10.1016/j.metabol.2012.08.001](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.08.001) PMID: [23040414](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23040414/)
49. Jin YJ, Cao PJ, Bian WH, Li ME, Zhou R, Zhang LY, et al. BDNF levels in adipose tissue and hypothalamus were reduced in mice with MSG-induced obesity. *Nutr Neurosci*. 2015; 18(8):376-82. doi: [10.1179/1476830515Y.00000000039](https://doi.org/10.1179/1476830515Y.00000000039) PMID: [26230366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26230366/)
50. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 2008; 4(2):89-96. PMID: [23675073](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23675073/)
51. Körner A, Wabitsch M, Seidel B, Fischer-Posovszky P, Berthold A, Stumvoll M, et al. Adiponectin expression in humans is dependent on differentiation of adipocytes and down-regulated by humoral serum components of high molecular weight. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 337(2):540-50. doi: [10.1016/j.bbrc.2005.09.064](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.064) PMID: [16202386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16202386/)
52. Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J M Endocrinol*. 2011; 46(2):R65-72. doi: [10.1530/JME-10-0169](https://doi.org/10.1530/JME-10-0169) PMID: [21247979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21247979/)
53. Martos-Moreno GÁ, Barrios V, Chowen JA, Argente J. Adipokines in childhood obesity. *Vitam Horm*. 2013; 91:107-42. doi: [10.1016/B978-0-12-407766-9.00006-7](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407766-9.00006-7) PMID: [23374715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23374715/)
54. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011; 121(6):2094-101. doi: [10.1172/JCI45887](https://doi.org/10.1172/JCI45887) PMID: [21633177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21633177/)

55. Wosiski-Kuhn M, Erion JR, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE, Stranahan AM. Glucocorticoid receptor activation impairs hippocampal plasticity by suppressing BDNF expression in obese mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; 42:165-77. doi: [10.1016/j.psyneuen.2014.01.020](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.020) PMID: [24636513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24636513/)
56. Çatlı G, Dünder NO, Dünder BN. Adipokines in breast milk: an update. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2014; 6(4):192-201. doi: [10.4274/Jcrpe.1531](https://doi.org/10.4274/Jcrpe.1531) PMID: [25541889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25541889/)
57. Zarban A, Toroghi MM, Asli M, Jafari M, Vejdani M, Sharifzaden G. Effect of Vitamin C and E Supplementation on Total Antioxidant Content of Human Breastmilk and Infant Urine. *Breastfeed Med*. 2015; 10(4):214-7. doi: [10.1089/bfm.2014.0143](https://doi.org/10.1089/bfm.2014.0143) PMID: [25915716](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25915716/)
58. Prodam F, Ricotti R, Agarla V, Parlamento S, Genoni G, Balossini G, et al. High-end normal adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels are associated with specific cardiovascular risk factors in pediatric obesity: a cross-sectional study. *BMC Med*. 2013; 11:44. doi: [10.1186/1741-7015-11-44](https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-44) PMID: [23425018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23425018/)
59. Romacho T, Glosse P, Richter I, Elsen M, Schoemaker MH, van Tol EA, et al. Nutritional ingredients modulate adipokine secretion and inflammation in human primary adipocytes. *Nutrients*. 2015; 7(2):865-86. doi: [10.3390/nu7020865](https://doi.org/10.3390/nu7020865) PMID: [25629558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25629558/)

Table 1. Sample characterization.

Sample characterization		Normal-weight (n=25)	Overweight/obese (n=25)	P
Gender	F(%)			1.00 ^a
Boys		16 (50.0%)	16 (50.0%)	
Girls		9 (50.0%)	9 (50.0%)	
Socioeconomic status	F(%)			1.00 ^b
B		4 (57.1%)	3 (42.9%)	
C		17 (50.0%)	17 (50.0%)	
D		4 (44.4%)	5 (55.6%)	
Maternal education	F(%)			0.76 ^b
Incomplete primary school		4 (57.1%)	3 (42.9%)	
Incomplete high school		7 (51.3%)	5 (41.7%)	
Incomplete higher education		13 (48.1%)	14 (51.9%)	
Higher education diploma		1 (25.0%)	3 (75.0%)	
Exclusive breastfeeding until 6 months				0.57 ^a
F(%)		10 (43.5%)	13 (56.5%)	
Yes		15 (55.6%)	12 (44.4%)	
No				
Vitamin supplement				1.00 ^b
F(%)		4 (50.0%)	4 (50.0%)	
Yes		21 (50.0%)	21 (50.0%)	
No				
Age (days)				0.99 ^c
Mean (\pm SEM)		357.88 (\pm 30.07)	358.00 (\pm 29.91)	
Body weight (Kg)				0.0001 ^{c*}
Mean (\pm SEM)		8.97 (\pm 0.32)	12.19 (\pm 0.55)	
Body length (cm)				0.28 ^c
Mean (\pm SEM)		73.30 (\pm 1.43)	75.55 (\pm 1.52)	
BMI (Kg/m ²)				0.0001 ^{c*}
Mean (\pm SEM)		16.62 (\pm 0.21)	21.04 (\pm 0.23)	

F, frequency; SEM, standard error mean; BMI, body mass index.

^aChi-Square; ^bFisher's exact test; ^cStudent's unpaired t-test.

*Significant difference (p<0.05).

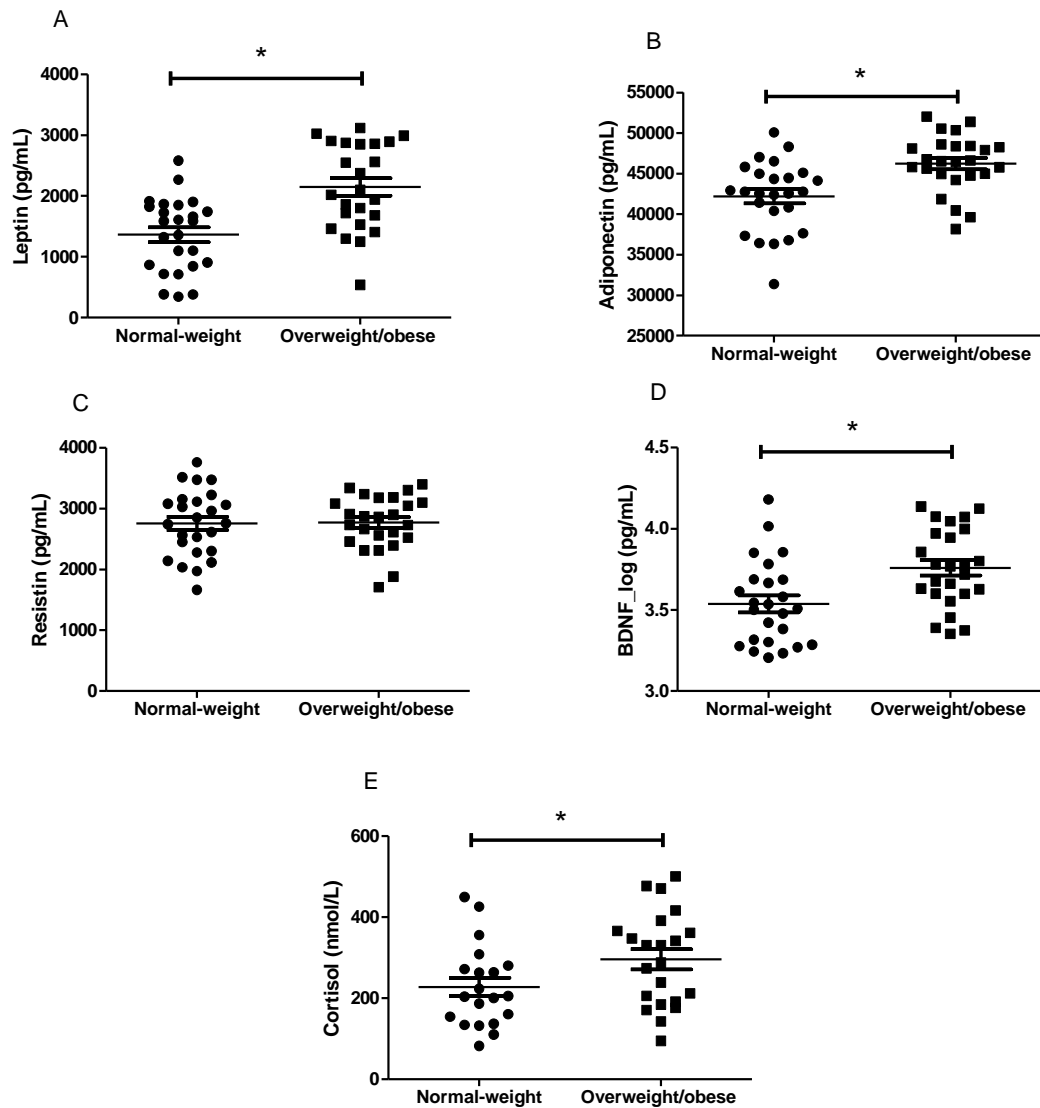


Fig 1. Plasma levels of leptin, adiponectin, resistin, BDNF and serum level of cortisol in two groups. A-D: n=25 in each group. D: BDNF was expressed in log. E: n=22 in overweight/obese and n=20 in normal-weight group. Values are expressed as mean \pm SEM. *Differences were considered to be significant at p<0.05.

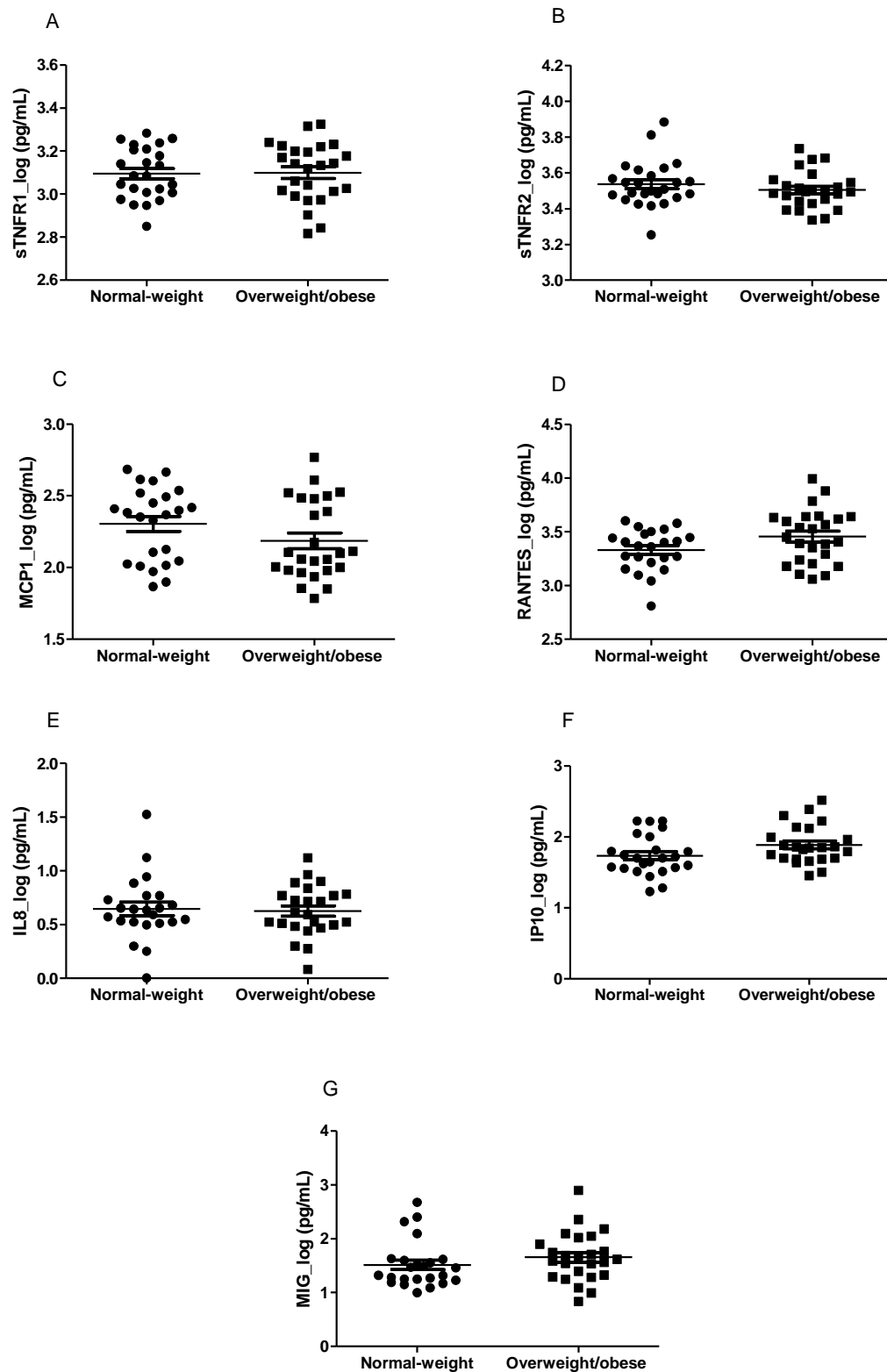


Fig 2. Plasma levels of soluble receptors of TNF (sTNFR1 and sTNFR2) and chemokines (MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 and MIG) in normal-weight and overweight/obese infants. A-G: n=25 in each group. Values are expressed in log as mean \pm SEM.

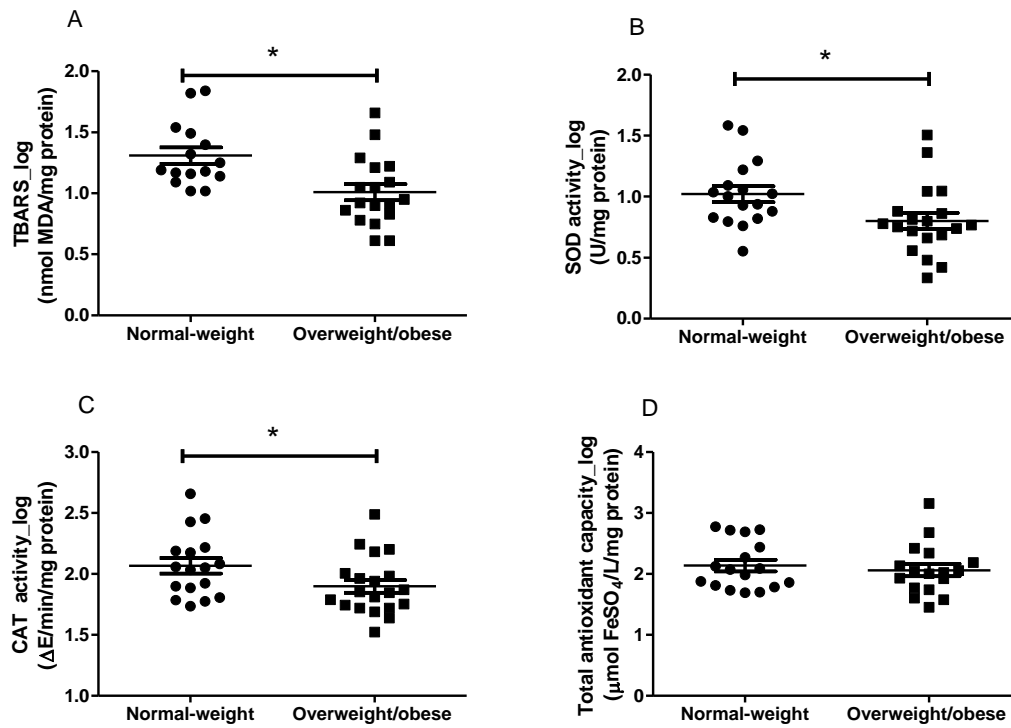


Fig 3. Redox status in normal-weight and overweight/obese infants. A-D: n=18 in each group. Values are expressed in log as mean±SEM. *Differences were considered to be significant at $p < 0.05$.

APÊNDICE D – ARTIGO 2

Artigo submetido à revista: Research in Developmental Disabilities

Fator de impacto: 1.887 **Qualis Ciências Biológicas II:** B1

Research in Developmental Disabilities

Submissions Being Processed for Author Ana Cristina Resende Camargos, M.S.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Send E-mail	RIDD-D-16-00291	Overweight and Obese Infants Present Lower Cognitive and Motor Development Scores than Normal-Weight Peers	Jun 10, 2016	Jul 05, 2016	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Help | Privacy Policy | Terms and Conditions | About Us

Copyright © 2016 Elsevier B.V. All rights reserved. Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.

Pesquisar na Web e no Windows

09:24 03/08/2016

OVERWEIGHT AND OBESE INFANTS PRESENT LOWER COGNITIVE AND MOTOR DEVELOPMENT SCORES THAN NORMAL-WEIGHT PEERS

Ana Cristina Resende Camargos^{a,b*}, Vanessa Amaral Mendonça^{a,b}, Camila Alves de Andrade^a, Katherine Simone Caires Oliveira^a, Ana Cristina Rodrigues Lacerda^{a,b}.

^aDepartamento de Fisioterapia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

^bPrograma Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia, Diamantina, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: anacristinarcamargos@gmail.com

Clínica de Fisioterapia

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000
Alto da Jacuba - Diamantina/MG - CEP 39100-000

Abstract

Aims: Compare the cognitive and motor development in overweight/obese infants versus normal-weight peers and investigate the correlation of anthropometric variables and cognitive and motor development.

Methods: We conducted a cross-sectional study with 28 overweight/obese infants and 28 normal-weight peers between 6 and 24 months of age. Both groups were evaluated with cognitive and motor scales of the Bayley-III infant development test. The t test for independent samples was performed to compare the groups, and the Spearman correlation was used to verify the association between variables.

Results: Overweight /obese infants showed lower cognitive and motor composite scores than their normal-weight peers. A significant negative association was found of body weight and body length with cognitive development and of body mass index with motor development.

Conclusion: This is the first study to show evidence of worse cognitive and motor performance in overweight/obese infants when compared with normal-weight peers between 6 and 24 months of age.

Keywords: obesity; overweight; infant; child development; cognition; motor skills.

What this paper adds?

The literature has shown that overweight or obese children in preschool and elementary school present decreased cognitive and motor performance. This was the first study to compare cognitive and motor development in overweight/obese infants and normal-weight peers matched by gender, age, socioeconomic status, maternal education and exclusive breastfeeding until 6 months of age.

We demonstrated that overweight/obese infants presented lower cognitive and motor development scores than normal-weight infants between 6 and 24 months of age. The difference between groups was moderate, indicating that overweight/obese infants do not have important and cognitive impairments like infants with motor disabilities. However, their impairments may well be more subtle and less catastrophic, but can have a negative impact on school age. Moreover, inverse associations of body mass index with motor development, and body weight and body length with cognitive development were found.

1. Introduction

The increasing prevalence of childhood obesity is one of the world's most serious public health issues (Sabin, Kao, Juonala, Baur, & Wake, 2015). In the last decades, overweight and obesity is increasing in very young children, including infants (Kim et al., 2006). According WHO, infants with body mass index (BMI) \geq 97th and $<$ 99th percentile are considered overweight and infants with BMI \geq 99,9 percentile are obese (WHO Multicentre Growth Reference Study Group, 2006). In 2011-2012, 8.1% of infants and toddlers from birth to 2 years of age were considered obese in the United States (Ogden, Carroll, Kit, & Flegal, 2014). In Brazil, 6.5% of children younger than 2 years of age are overweight or obese (Cocetti, Taddei, Konstantyner, Konstantyner, & Barros Filho, 2012). The excessive accumulation of adipose tissue is associated with poor health outcomes due to several metabolic and cardiovascular complications throughout life (Sorisky, Molgat, & Gagnon, 2013). Moreover, excess weight may limit cognitive and motor development in childhood (Castetbon & Andreyeva, 2012; Miller & Spencer, 2014; Mond, Stich, Hay, Kraemer, & Baune, 2007; Nervik, Martin, Rundquist, & Cleland, 2011; Reinert, Po'e, & Barkin, 2013).

In regard to cognitive aspects, studies have shown overweight or obese children in preschool and elementary school have a lower performance on cognitive tests that can affect the children's school outcomes and persist throughout life (Datar & Sturm, 2006; Miller & Spencer, 2014; Reinert, et al., 2013). However, confounding factors such as environmental stimuli, parental education and feeding practices can interfere with cognitive function in childhood. When confounding factors are controlled, no significant association is found between body mass index (BMI) and cognitive ability (Cai, et al., 2015; Gibbs & Forste, 2014; Veldwijk, Scholtens, Hornstra, & Bemelmans, 2011).

Excess weight may also hinder children's movement and normal levels of activity and thereby compromise motor development (Schmidt Morgen, et al., 2014). Most studies have shown an inverse relationship between BMI and gross and fine motor development in preschool, elementary and middle school children (Castetbon & Andreyeva, 2012; D'Hondt, Deforche, De Bourdeaudhuij, & Lenoir, 2008; Mond, et al., 2007; Nervik, et al., 2011). Factors such as gender, age and socioeconomic status may also interfere with this outcome (Castetbon & Andreyeva, 2012; Grantham-McGregor, et al., 2007; Mond, et al., 2007; Slining, Adair, Goldman, Borja, & Bentley, 2010; Taanila, Murray, Jokelainen, Isohanni, & Rantakallio, 2005).

Most studies evaluated children starting from 3 years of age, and there is only one known study that investigates the relationship between overweight infants and motor development (Slining, et al., 2010). These authors conducted a longitudinal study with infants

between 3 and 18 months of age and found motor delay was 1.80 times as likely in overweight infants compared with non-overweight infants. However, cognitive development has not been investigated.

Because the most rapid brain changes occur during the first 2 years of life (Johnson, 2001), this time interval represents the critical period in cognitive and motor development (Taanila, et al., 2005). The brain develops rapidly and small perturbations in these processes can have long-term effects on the brain's structural and functional capacity (Grantham-McGregor, et al., 2007). Thus, evaluating whether excess weight during infancy affects cognitive and motor development is important.

No study to date has evaluated the cognitive and motor development of infants between 6 and 24 months of age with control of confounding variables such as gender, socioeconomic status, maternal education and duration of exclusive breastfeeding. Thus, the objectives of this study were 1) to compare the cognitive and motor development in overweight/obese infants versus normal weight peers matched for gender, age, socioeconomic status, maternal education and exclusive breastfeeding until 6 months of age and 2) to investigate the association of anthropometric variables (BMI, body weight and body length) with cognitive and motor development in this age interval. We hypothesized that overweight/obese infants will have lower cognitive and motor development scores when compared to normal-weight peers and that there will be an inverse relationship between anthropometric variables and cognitive and motor development.

2. Method

2.1. Participants

Fifty-six infants aged between 6 and 24 months participated in this study. The overweight/obese group included infants with BMI \geq 97th percentile (z score $> +2$). For each overweight/obese infant, a normal-weight peer was matched for gender, age, socioeconomic status, maternal education and duration of exclusive breastfeeding. These participants were recruited from registration data from Family Health Strategies. Normal-weight peers had to have BMI ≥ 3 and < 85 th percentile (z score > -2 and $< +1$). These participants were classified on the basis of the World Health Organization (WHO) Child Growth Standards from 0 to 5 years, according to the BMI-for-age cut-off points relative to age and gender (de Onis & Lobstein, 2010; WHO Multicentre Growth Reference Study Group, 2006). Exclusion criteria were: preterm and low birth weight infants; infants with pregnancy and delivery complications; infants with signs of malnutrition or illness that interfere with growth and

development; and infants who had some infectious process (fever, influenza, diarrhea, ear infections, etc.) in the past 15 days.

Because of the lack of studies in this age interval, a pilot study was initially conducted with 11 children in each group to calculate the sample size. A minimum difference of 1.27 between the groups and an SD of 2.38 for cognitive composite score were considered. Thus, 28 participants were required for each group.

2.2. Measurements

The BMI was calculated on the basis of the body weight and body length measurements. A pediatric electronic scale (Welmy®), with a 15kg capacity and an accuracy of 5g, was used to weigh the infants. The infants were placed sitting at the center of the balance, without clothes, shoes or diapers. A portable infant stadiometer (Seca®), with resolution in millimeters, was used to measure the infant length. The infants remained supine on a rigid, flat surface, with the head in a straight position, chin away from the chest, arms extended along the body, legs straight and heels in contact with the surface of the stadiometer, without shoes or accessories in their hair. These measurements were performed by the same properly trained examiner. The WHO Anthro software version 3.2.2 was used to calculate the BMI-for-age, expressed as z-scores. (World Health Organization, 2011).

The Brazilian Criteria of Economic Classification, developed by the Brazilian Association of Research Companies, was used to assess the socioeconomic status of families. This questionnaire takes into account the tangible household characteristics, such as possession and quantity of durable goods, number of bathrooms, employment of domestic workers and educational level of the head of household. The economic status was defined by the sum of scores ranging from A1, A2, B1, B2, C1, C2, D and E, where A1 indicates the highest economic class and E the lowest economic class (Brazilian Association of Research Companies, 2003). Classes were grouped into A, B, C, D and E.

Infant development was performed using the Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 3rd edition (Bayley-III). The Bayley-III is a gold-standard instrument that assesses the developmental functioning and identifies infant and children with developmental delay between 1 month and 42 months of age. The instrument has five scales: cognitive, language, motor, social-emotional and adaptive behavior. This study used only cognitive and motor scales, which were assessed by direct observation and interaction with the child. Scaled scores were derived from the subtest total raw scores and the composite scores were derived from sums of the subtest scaled scores. Composite scores were generated from the

cognitive scale and motor scale, with a mean of 100 and a standard deviation (SD) of 15 (Bayley, 2006).

2.3. Procedure

This study was approved by the Scientific Ethics Committee of the Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (protocol no. 085/12). A cross-sectional study was conducted with infants enrolled in Family Health Strategies in the city of Diamantina, Minas Gerais, Brazil, which comprises a Delivering Community-Based Primary Care in a Universal Health System. A visit to the home of the selected infants was performed to explain to parents and/or guardians the study's objectives and procedures. Those parents who agreed to participate signed a consent form and answered questions about age, duration of exclusive breastfeeding and infant health data. The instrument for the socioeconomic status evaluation was also applied.

Infants were always taken to the same location, the Laboratory of Pediatrics, to perform body weight and body length measurements. The Bayley-III test was also conducted individually in a standardized manner, using the specific kit. The total administration time lasted between 50 and 90 minutes, depending on infant age.

Three researchers were trained for the application of tests, and inter-rater reliability was established (ICC = .98 - .99).

2.4. Statistical analysis

The data were analyzed using the SPSS statistical package, version 17.0 (Inc., USA), and graphs were prepared in GraphPad Prism, version 5.0 (Inc., USA). Descriptive statistics were performed to characterize the sample, and the Chi-square test or Fisher's exact test was used to compare the proportions of the two groups. Numerical variables were log transformed. The Shapiro-Wilk test was used to verify the normality of the data, and the Levene test was employed to verify the homogeneity of variance. A t test for independent samples was performed to compare the groups. The size effect and the statistical power were checked for cognitive and motor composite scores. The Spearman correlation was used to verify the association between anthropometric parameters (BMI, body weight and body length) with cognitive and motor composite scores. The significance level was 5% ($\alpha < 0.05$).

3. Results

Fifty-six infants were evaluated (28 in the overweight/obese group and 28 in the normal-weight group), including 22 girls and 34 boys. In the overweight/obese group, 22 participants were overweight and 6 were obese. Descriptive and comparative statistics from the main group characteristics are presented in Table 1. As expected, there was no difference between the two groups regarding age, gender, socioeconomic status, maternal education and exclusive breastfeeding ($p>0.05$). The groups only differed in the body weight and BMI, which was higher in the overweight/obese group.

Significant differences were found in cognitive and motor composite scores between groups, and lower scores were obtained for the overweight/obese group than for their normal-weight peers (Table 2). The calculation of statistical power, considering an effect size of 0.59 and 0.55 respectively (α value = 0.5), revealed a statistical power of 60% for cognitive composite scores and a statistical power of 55% for motor composite scores. This result showed that the difference between groups was moderate.

All the infants in the normal-weight group had cognitive and motor composite scores within the average values expected for the test (100 ± 15). For the overweight/obese group, just one infant (3.6%) had a cognitive composite score lower than the test average, and four children (14.3%) had motor composite scores lower than the test average (below 85) and were ranked as delayed development.

Finally, significant weak negative associations of body weight and body length with cognitive development and of BMI with motor development were found. No significant correlation was identified between BMI and cognitive development and, of body weight and body length with motor development (Figure 1).

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to evaluate cognitive and motor development in overweight/obese infants as compared to normal-weight peers in the first two years of life. Overweight/obese infants had lower cognitive and motor development scores than normal-weight infants between 6 and 24 months of age, with a moderate effect size.

With regard to cognition, most previous studies did not assess the difference between groups, but showed that there is an inverse relationship between BMI and cognitive development (Datar & Sturm, 2006; Reinert, et al., 2013). In the present study, differences were found between groups, but there was no significant association between BMI and cognitive development of infants. According to Veldwijk, et al. (2011), the association between BMI and cognitive ability was only identified when authors did not adjust their

analyses for important confounding factors such as children's physical fitness and maternal intelligence. Mothers with higher educational levels are likely to engage in parenting behavior that, in turn, improves children's cognitive development (Gibbs & Forste, 2014). Breastfeeding also has beneficial effects for some aspects of memory and language development in the first 2 years of life (Cai, et al., 2015). It is important to emphasize that the groups were matched for maternal education, socioeconomic status and exclusive breastfeeding until 6 months of age in the present study. Given this fact, the internal control of the study allowed us to infer that the difference found between the groups was due to excess infant weight.

Moreover, a weak negative association of body weight and body length with cognitive development was found. Other studies showed that anthropometric status indicators are significantly associated with cognitive performance (Heinonem, et al., 2008; Sandjaja, et al., 2013). These authors founded negative association between body weight and BMI with cognition, and positive association between body height and cognition. It is important to consider that the majority of studies evaluated the cognitive abilities by IQ (intelligence quotient) tests. While cognitive development is not IQ, it raises the question whether this finding is an artifact of the sample size.

With respect to motor development, this study evaluated the motor composite score, which comprises gross and fine motor development. According to other studies (Castetbon & Andreyeva, 2012; Chivers, Larkin, Rose, Beilin, & Hands, 2013; D'Hondt, et al., 2008; D'Hondt, et al., 2013; Gentier, et al., 2013; Mond, et al., 2007; Nervik, et al., 2011; Slining, et al., 2010), gross and fine motor development was lower in the overweight/obese group. The present study also verified a weak negative association of BMI with motor development. Morgen, et al. (2014) also found minimal associations between motor development and weight status, suggesting that weight status and motor milestones are largely independent of one another. However, in the study of Castetbon & Andreyeva (2012) the association between gross motor skills and BMI varied with the type of skills, with some differences observed across gender and age intervals. These authors observed that only gross motor skills with relatively high energy expenditure, such as hopping and jumping distance, were inversely associated with obesity, but most motor skills were not impaired in obese or overweight children of 4 and 5-6 years of age. In the current study, the gross motor skills, evaluated by the Bayley-III test, were in accordance with motor milestones and dependent upon the infant's age interval. Thus, younger and older infants performed different tasks, and this study could not determine whether a particular ability was impaired by excess infant weight.

A low gross motor performance of overweight/obese infants is usually related to biomechanical issues and morphological constraints on tasks involving changes in center of mass (Chivers, et al., 2013). However, for Gentier, et al. (2013) the motor incompetence of obese children's should be addressed from a broader perspective, beyond a mechanical explanation. These authors showed that obese children were slower than normal-weight peers in terms of executive functions and decision-making to plan and control movement, suggesting that childhood obesity is also associated with both impaired perceptual-motor function and fine motor development. D'Hondt, et al. (2008) demonstrated that elementary and middle-school-age obese children had greater difficulties with the peg placing task than their normal-weight peers, even while seated in tasks that required no postural control. According to Chivers, et al. (2013), low performance in handling skills of overweight children may be due to constraints from fat mass on fingers, which limits both the accuracy and speed of task completion. In the current study, the infants performed the items indicated by the fine motor scale in the sitting position on their mothers' laps and, therefore, mothers could support the infants' trunks without interfering with the task performed.

All the aforementioned studies evaluated older children than those participating in the present study, making it difficult to compare the results. Only the study of Slining, et al. (2010) evaluated motor development, but not cognitive development, in a similar age range using the BSID-II development scale, which corresponds to the 2nd version of the Bayley test. In this longitudinal study confounding variables were controlled, such as gender, age, mother's age, weight and educational level, and the authors found a negative relationship between BMI and motor development in infants with a low socioeconomic status. Considering that variability is a peculiar characteristic of motor development, which can be influenced by several factors such as socioeconomic status (Grantham-McGregor, et al., 2007; Taanila, et al., 2005), gender (Castetbon & Andreyeva, 2012; Mond, et al., 2007) and age (Chivers, et al., 2013), most of the sample demonstrated medium socioeconomic status (C class) in the present study, according the Brazilian Criteria of Economic Classification, minimizing the influence of this factor on motor development.

The assessment tools varied between the studies and often evaluated different constructs. Cognitive abilities were assessed in some studies through IQ tests and executive function during childhood. Fine and gross motor skills were also evaluated with different tests. Therefore, comparisons should be generalized with caution. We used the Bayley-III test, considered the gold standard for evaluation of infant development. However, it is worth mentioning that the Bayley-III test is an instrument designed to detect frank disability and

may have limited ability to detect more subtle dysfunction that may affect the development outcomes at school age. Although overweight/obese infants presented a lower performance in the Bayley-III test, most of them had composite scores within the expected average values for the test, which indicates cognitive and motor development within normal limits.

It should be noted that the sample consisted of infants with overweight and obesity. This question may have increased the variability of cognitive and motor composite scores and reduced the power and effect size. Thus, we believed that the differences between the groups can be larger, if the group had only obese infants. Furthermore, overweight/obese infants do not have important cognitive and motor impairments like infants with disabilities, which may also explain a moderate power and size effect. However, their impairments may well be more subtle and less catastrophic, but can have a negative impact on school age. Other studies suggest that infants with subtle motor and cognitive impairments will go on to experience significant motor, cognitive, behavioral and learning difficulties at school age (Goyen & Lui, 2009).

Despite some limitations in the study, this was the first study that was rigorous controlled to minimize bias. A wide age range (6-24 months) was used, but for each overweight/obese infant included, a normal-weight peer was matched for gender, age, socioeconomic status, maternal education and duration of exclusive breastfeeding. Given this fact, the internal control of the study allowed shows that overweight/obese infants presented worse cognitive and motor performance. It is also important to consider that the composite score of Bayley-III test allows to evaluate and to compare all infants regardless of age interval.

Finally, it is important to consider that childhood obesity is related to neuro-endocrine-inflammatory effects (Miller & Spencer, 2014), which may be related to child development. Future studies should determine whether those physiological changes are already present during infancy and whether they are related to motor and cognitive development in this age interval.

5. Conclusion

This is the first study to show evidence of worse cognitive and motor performance in overweight/obese infants when compared with normal-weight peers between 6 and 24 months of age.

Acknowledgments

We thank the Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) for institutional support, the CNPq, FAPEMIG, and CAPES for financial support and scholarships. The authors are in debt to professor David Lee Nelson (UFVJM) for kindly reading the manuscript.

References

- Bayley, N. (2006). *Bayley scales of infant and toddler development: Administration manual*: Harcourt Assessment.
- Brazilian Association of Research Companies (2003). Brazilian Criteria of Economic Classification. <http://www.abep.org/criterioBrasil.aspx>. Accessed 10.07.2014.
- Cai, S., Pang, W. W., Low, Y. L., Sim, L. W., Sam, S. C., Bruntraeger, M. B., et al. (2015). Infant feeding effects on early neurocognitive development in Asian children. *Am J Clin Nutr*, 101, 326-336.
- Castetbon, K., & Andreyeva, T. (2012). Obesity and motor skills among 4 to 6-year-old children in the United States: nationally-representative surveys. *BMC Pediatr*, 12, 28.
- Chivers, P., Larkin, D., Rose, E., Beilin, L., & Hands, B. (2013). Low motor performance scores among overweight children: Poor coordination or morphological constraints? *Human movement science*, 32, 1127-1137.
- Cocetti, M., Taddei, J. A., Konstantyner, T., Konstantyner, T. C., & Barros Filho, A. A. (2012). Prevalence and factors associated with overweight among Brazilian children younger than 2 years. *J Pediatr (Rio J)*, 88, 503-508.
- D'Hondt, E., Deforche, B., De Bourdeaudhuij, I., & Lenoir, M. (2008). Childhood obesity affects fine motor skill performance under different postural constraints. *Neurosci Lett*, 440, 72-75.
- D'Hondt, E., Deforche, B., Gentier, I., De Bourdeaudhuij, I., Vaeyens, R., Philippaerts, R., et al. (2013). A longitudinal analysis of gross motor coordination in overweight and obese children versus normal-weight peers. *International journal of obesity*, 37, 61-67.
- Datar, A., & Sturm, R. (2006). Childhood overweight and elementary school outcomes. *International journal of obesity*, 30, 1449-1460.
- de Onis, M., & Lobstein, T. (2010). Defining obesity risk status in the general childhood population: which cut-offs should we use? *Int J Pediatr Obes*, 5, 458-460.
- Gentier, I., Augustijn, M., Deforche, B., Tanghe, A., De Bourdeaudhuij, I., Lenoir, M., et al. (2013). A comparative study of performance in simple and choice reaction time tasks

- between obese and healthy-weight children. *Research in developmental disabilities*, 34, 2635-2641.
- Gentier, I., D'Hondt, E., Shultz, S., Deforche, B., Augustijn, M., Hoorne, S., et al. (2013). Fine and gross motor skills differ between healthy-weight and obese children. *Research in developmental disabilities*, 34, 4043-4051.
- Gibbs, B. G., & Forste, R. (2014). Breastfeeding, parenting, and early cognitive development. *J Pediatr*, 164, 487-493.
- Goyen, T.A., Lui, K. (2009). Developmental coordination disorder in "apparently normal" schoolchildren born extremely preterm. *Archives of disease in childhood*, 94, 298-302.
- Grantham-McGregor, S., Cheung, Y. B., Cueto, S., Glewwe, P., Richter, L., & Strupp, B. (2007). Developmental potential in the first 5 years for children in developing countries. *Lancet*, 369, 60-70.
- Heinonen, K., Raikkonen, K., Pesonen, A.K., Kajantie, E., Andersson, S., Eriksson, J.G., et al. (2008). Prenatal and postnatal growth and cognitive abilities at 56 months of age: a longitudinal study of infants born at term. *Pediatrics*, 121, 1325-1333.
- Johnson, M. H. (2001). Functional brain development in humans. *Nat Rev Neurosci*, 2, 475-483.
- Kim, J., Peterson, K. E., Scanlon, K. S., Fitzmaurice, G. M., Must, A., Oken, E., et al. (2006). Trends in Overweight from 1980 through 2001 among Preschool-Aged Children Enrolled in a Health Maintenance Organization. *Obesity*, 14, 1107-1112.
- Miller, A. A., & Spencer, S. J. (2014). Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun*, 42, 10-21.
- Mond, J. M., Stich, H., Hay, P. J., Kraemer, A., & Baune, B. T. (2007). Associations between obesity and developmental functioning in pre-school children: a population-based study. *Int J Obes (Lond)*, 31, 1068-1073.
- Nervik, D., Martin, K., Rundquist, P., & Cleland, J. (2011). The relationship between body mass index and gross motor development in children aged 3 to 5 years. *Pediatr Phys Ther*, 23, 144-148.
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Kit, B. K., & Flegal, K. M. (2014). Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *Jama*, 311, 806-814.
- Reinert, K. R., Po'e, E. K., & Barkin, S. L. (2013). The relationship between executive function and obesity in children and adolescents: a systematic literature review. *J Obes*, 2013, 820956.

- Sabin, M. A., Kao, K. T., Juonala, M., Baur, L. A., & Wake, M. (2015). Viewpoint article: Childhood obesity--looking back over 50 years to begin to look forward. *J Paediatr Child Health*, 51, 82-86.
- Sandjaja, Poh, B.K., Rojroonwasinkul, N., Le Nyugen, B.K., Budiman, B., Ng L.O., et al. (2013). Relationship between anthropometric indicators and cognitive performance in Southeast Asian school-aged children. *The British journal of nutrition*, 110, 57-64.
- Schmidt Morgen, C., Andersen, A. M., Due, P., Neelon, S. B., Gamborg, M., & Sorensen, T. I. (2014). Timing of motor milestones achievement and development of overweight in childhood: a study within the Danish National Birth Cohort. *Pediatr Obes*, 9, 239-248.
- Slining, M., Adair, L. S., Goldman, B. D., Borja, J. B., & Bentley, M. (2010). Infant overweight is associated with delayed motor development. *J Pediatr*, 157, 20-25 e21.
- Sorisky, A., Molgat, A. S., & Gagnon, A. (2013). Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go? *Adv Nutr*, 4, 67-75.
- Taanila, A., Murray, G. K., Jokelainen, J., Isohanni, M., & Rantakallio, P. (2005). Infant developmental milestones: a 31-year follow-up. *Dev Med Child Neurol*, 47, 581-586.
- Veldwijk, J., Scholtens, S., Hornstra, G., & Bemelmans, W. J. (2011). Body mass index and cognitive ability of young children. *Obes Facts*, 4, 264-269.
- WHO Multicentre Growth Reference Study Group (2006). WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. (2006). *Acta Paediatr Suppl*, 450, 76-85.
- World Health Organization (2011). WHO Anthro (version 3.2. 2, January 2011) and macros. *Geneva (Switzerland): World Health Organization*.

Table 1. Group characteristics in normal-weight and overweight/obese groups.

Sample characterization		Normal-weight (n=28)	Overweight/obese (n=28)	p
Gender	F(%)			1.00 ^a
Boys		17 (50.0%)	17 (50.0%)	
Girls		11 (50.0%)	11 (50.0%)	
Socioeconomic status	F(%)			1.00 ^b
B		4 (50.0%)	4 (50.0%)	
C		20 (51.3%)	19 (48.7%)	
D		4 (44.4%)	5 (55.6%)	
Maternal education	F(%)			0.85 ^b
Incomplete primary school		4 (57.1%)	3 (42.9%)	
Incomplete high school		7 (53.8%)	6 (46.2%)	
Incomplete higher education		16 (50.0%)	16 (50.0%)	
Higher education diploma		1 (25.0%)	3 (75.0%)	
Exclusive breastfeeding until 6 months	F(%)			0.59 ^a
Yes		12 (46.2%)	14 (53.8%)	
No		16 (53.3%)	14 (46.7%)	
Age (days)				0.99 ^c
Mean (±SD)		362.64 (±159.05)	362.96 (±159.05)	
Body weight (Kg)				0.0001 ^{c*}
Mean (±SD)		8.99 (±1.59)	12.13 (±2.68)	
Body length (cm)				0.27 ^c
Mean (±SD)		73.34 (±7.24)	75.49 (±7.44)	
BMI (Kg/m ²)				0.0001 ^{c*}
Mean (±SD)		16.65 (±1.07)	20.99 (±1.13)	

F, frequency; BMI, body mass index.

^aChi-Square; ^bFisher's exact test; ^cT test for independent samples.

*Significant difference (p<0.05).

Table 2. Comparison the cognitive and motor composite scores between normal-weight and overweight/obese groups.

Composite scores	Normal-weight	Overweight/obese	t	p	95% CI
Cognitive	106.25 (\pm 8.35)	100.89 (\pm 9.72)	2.25	0.03*	[0.50-10.22]
Motor	102.14(\pm 9.86)	96.43(\pm 10.75)	2.13	0.04*	[0.18-11.24]

Values are mean (\pm SD).

CI, confidence interval.

*Significant difference ($p < 0.05$), t test for independent samples.

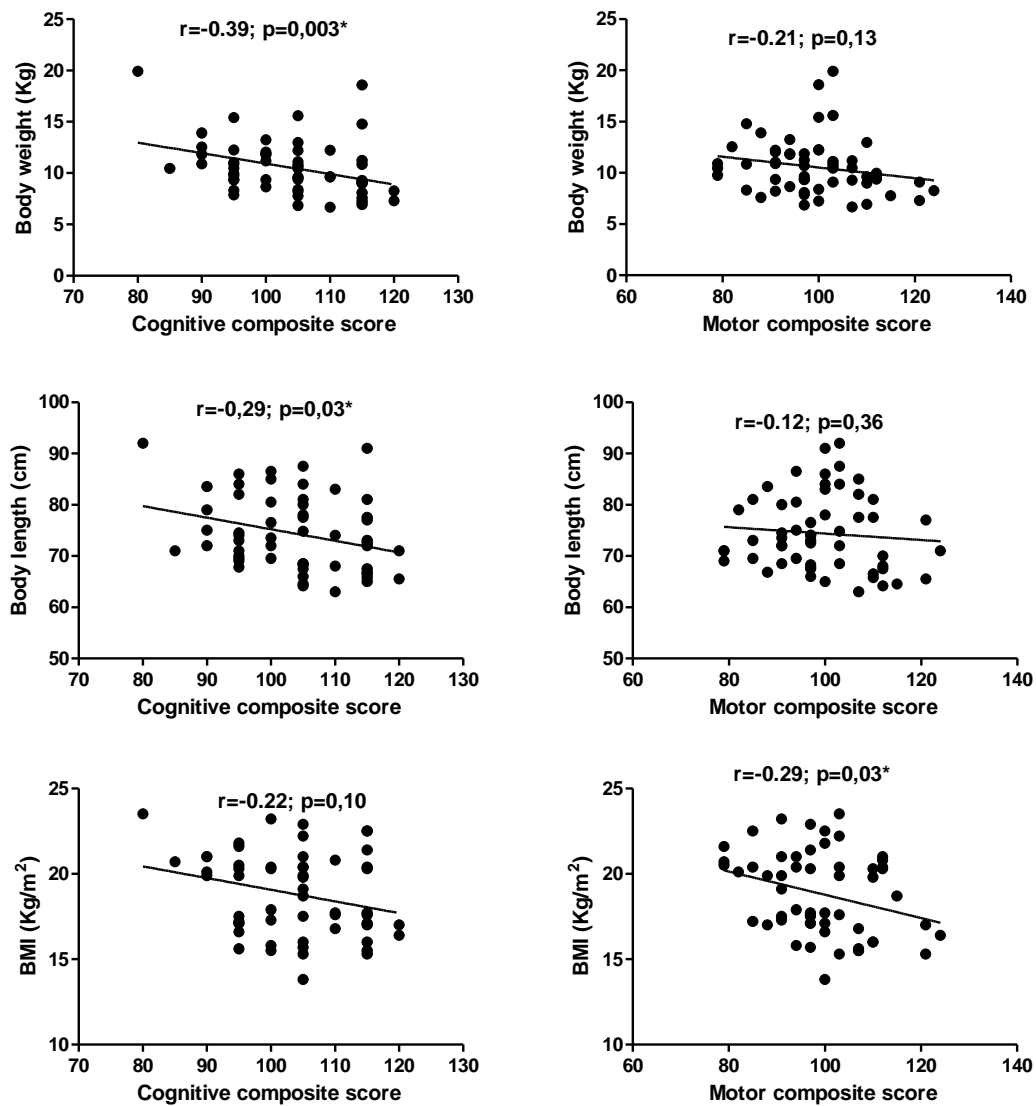


Figure 1. Correlation between anthropometric parameters (body weight, body length and BMI) with cognitive and motor composite scores.

Spearman correlation, *Significant correlation ($p < 0.05$).

APÊNDICE E – ARTIGO 3

Artigo submetido à revista: The Journal of Pediatrics

Fator de impacto: 3.890

The screenshot shows the Elsevier Editorial System (EES) interface for The Journal of Pediatrics. The page displays the journal logo, navigation links, and a table of submissions for author Ana Cristina R. Lacerda. The table shows one submission titled 'Association between Obesity-related Biomarkers and Cognitive and Motor Development in Infants' submitted on Aug 02, 2016, with a status of 'Submitted to Journal'.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Association between Obesity-related Biomarkers and Cognitive and Motor Development in Infants	Aug 02, 2016	Aug 02, 2016	Submitted to Journal

Association between Obesity-related Biomarkers and Cognitive and Motor Development in Infants

Short title: Obesity biomarkers and infant development

Ana Cristina Resende Camargos, M.S.^{1,2}, Vanessa Amaral Mendonça, PhD^{1,2}, Hércules Ribeiro Leite, PhD^{1,2}, Erica Leandro Marciano Vieira, PhD³, Antônio Lúcio Teixeira Júnior, PhD³, Ana Cristina Rodrigues Lacerda, PhD^{1,2*}.

¹Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brazil.

²Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia, Diamantina, Brazil.

³Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author

Clínica de Fisioterapia

Endereço: Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000

Alto da Jacuba - Diamantina/MG - CEP 39100-000

E-mail: lacerdaacr@gmail.com / lacerda.acr@ufvjm.edu.br

Keywords: adipokines, hormones, oxidative stress, infant obesity.

The authors declare no conflict of interest and no form of payment was given to produce the manuscript.

Abstract

Objective: To verify the association between obesity-related biomarkers and cognitive and motor development in infants between 6 and 24 months of age.

Study design: A cross-sectional study was conducted with 50 infants and plasma levels of leptin, adiponectin, resistin, soluble tumor necrosis factor receptors 1 (sTNFR1) and 2, chemokines, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), serum cortisol and redox status were measured. Bayley-III test was utilized to evaluate cognitive and motor development and multiple linear stepwise regression models were performed to verify the association between selected biomarkers and cognitive and motor development.

Results: A significant association was found between leptin and sTNFR1 plasma levels with cognitive composite scores, and these two independent variables together explained 37% of the variability of cognitive composite scores ($p=0.001$). Only sTNFR1 plasma levels were associated and explained 24% of the variability of motor composite scores ($p=0.003$).

Conclusions: Plasma levels of sTNFR1 predict cognitive and motor scores in infants between 6 and 24 months of age by a mechanism that seems not be linked to weight excess. Moreover, it seems the increase of leptin plasma levels create an environment that predisposes to pro-inflammatory response related to obesity and reduces the cognitive development in this age range.

The first 24 months of age represent an important period for overweight and obesity-related health problems development (1). In this period, the brain develops rapidly (2) and

early unfavorable conditions affecting health and growth of infants can impair a typical brain development. Then, the exposure to potential effects of obesity-related biomarkers may affect the organization of brain function (3) during a critical period for cognitive and motor skill acquisition (4).

Introduction

Adipokines produced and secreted by adipose tissue communicate with multiple tissues and organ systems, including the brain, to regulate metabolism (5). Some adipokines such as leptin have central actions in hypothalamus and hippocampus which in turn affects growth, maturation and brain development (6, 7). In the adipose tissue of obese individuals other adipokines contributes to a state of chronic low-grade inflammation observed in obesity leading to neuroinflammation (5, 8). In this context, the central nervous system can be affected by inflammatory mediators from the periphery (9), since the increased levels of the systemic pro-inflammatory biomarkers may cross the blood-brain barrier thus and may potentially impair critical learning skills (5). Additionally, redox imbalance, cortisol hormone and neurotrophic factors can affect the brain structure and function affecting neurodevelopment (10-13).

Overweight and obesity childhood are associated with a cascade of neuroendocrine and inflammatory changes in order to activate a chronic low-grade inflammation state and redox imbalance. Studies have shown that higher levels of leptin, resistin, soluble tumour necrosis factor receptors 1 (sTNFR1) and 2 (sTNFR2), chemokines, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and cortisol, as well as lower levels of adiponectin, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in overweight or obese school-age children (14-17). Moreover, a prior study of our research group has showed higher levels of leptin, adiponectin, BDNF and cortisol, as well as lower levels of TBARS and lower SOD and CAT activity in overweight/obese infants compared with normal-weight peers between 6 and 24 months of age (unpublished data).

In this context, few studies have considered possible biomarkers linking obesity and developmental outcomes (5, 11). Considering that some studies have demonstrated that overweight and obesity childhood present inverse relationship with cognitive and motor development (18, 19), we hypothesized that obesity-related biomarkers would be associated with cognitive and motor development in childhood.

Then, the aim of this study was to verify the association between the plasmatic levels of adipokines [leptin, adiponectin, resistin, sTNFR1 and sTNFR2, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES), interleukin-8 (IL-8), interferon-inducible protein 10 (IP-10), monokine induced by interferon- γ (MIG)], BDNF, serum cortisol, TBARS levels, SOD and CAT activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) with cognitive and motor development in obese, overweight and normal-weight infants between 6 and 24 months of age.

Methods

A cross-sectional study was conducted with infants between 6 and 24 months enrolled in Family Health Strategies in the city of Diamantina, Minas Gerais, Brazil. The overweight/obese group was composed by infants with body mass index (BMI) \geq 97th percentile (z score $> +2$). For each overweight/obese infant, a normal-weight peer (BMI ≥ 3 and < 85 th percentile: z score > -2 and $< +1$) was selected to match for gender, age and socioeconomic status. These participants were classified based on World Health Organization BMI-for-age cut-off points relative to age and gender (20). Exclusion criteria were as follows: preterm infants; infants with signs of malnutrition or disease that interferes with growth and development; infants who had some infectious process (fever, influenza, diarrhea, ear infections, etc.) or who were vaccinated in the past 15 days and; infants using any medication. This study was approved by the Scientific Ethics Committee of the Federal University of Jequitinhonha and Mucuri Valleys (protocol n $^{\circ}$. 085/12).

BMI was calculated based on body weight and body length measurements. A pediatric electronic scale (Welmy, São Paulo, Brazil), with 15kg capacity and accuracy of 5g, was used to weigh the infants. A portable infant stadiometer (Seca, Hamburgo, Germany), with resolution in millimeters, was used to measure infant length. These measurements were performed by the same examiner, properly trained. The World Health Organization Anthro software version 3.2.2 (Geneva, Switzerland) was used to calculate BMI-for-age, expressed as z -scores.

Infant development was performed using the Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 3rd edition (Bayley-III). The Bayley-III is a gold-standard instrument that assesses the developmental functioning and identifies infant and children with developmental delay between 1 month and 42 months of age. The instrument has five scales: cognitive, language, motor, social-emotional and adaptive behavior. This study used only cognitive and motor scales, which were assessed by direct observation and interaction with the child.

Scaled scores were derived from the subtest total raw scores and the composite scores were derived from sums of the subtest scaled scores. Composite scores were generated from the cognitive scale and motor scale, with a mean of 100 and a standard deviation of 15 (21).

Twenty-four hours after the development assessment, six milliliters of blood samples were collected following 3-hours fasting in the morning in a local laboratory. Then, the tubes (sodium heparin and serum) were centrifuged to remove cells and debris, and plasma, serum and erythrocytes aliquots were stored at -80°C.

Plasma leptin, adiponectin, resistin, BDNF and soluble TNF receptor (sTNFR1, sTNFR2) levels were measured using conventional sandwich ELISA kits (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The detection limits were 5.0 pg/mL for all kits.

Plasma chemokines (CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 e CXCL9/MIG) were measured using the cytometric bead arrays kit (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Bead flow cytometry allows the simultaneous quantification of various proteins in the same test. Samples were acquired in a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using the FCAP Array v1.0.1 software (Soft Flow Inc.). The detection limits were 0.2 pg/mL for IL-8, 1.0 pg/mL for RANTES, 0.2 pg/mL for MIG, 2.7 pg/mL for MCP-1 and 2.8 pg/mL for IP-10.

Serum cortisol was measured using competitive ELISA kit (IBL, AMERICA, Minneapolis, MN, USA) according to manufacturer's instructions. The detection limits were 55.2 nmol/L.

The redox status was assessed by TBARS concentration, antioxidants enzymes SOD and CAT activity, as well by FRAP in the erythrocyte lysate. The erythrocyte lysate was prepared as described by Glass and Gershon (22). Protein concentration of samples was determined by the Bradford method (23) using bovine serum albumin (BSA) (1mg/ml) as standard.

TBARS concentration was measured according to the method described by Ohkawa *et al.* (24) and the reaction of the thiobarbituric acid with malondialdehyde (MDA) was used to determine lipid peroxidation. TBARS concentration, expressed in nmol MDA/mg protein, was determined from the standard curve constructed with known concentrations of MDA (1,1,3,3-tetramethoxypropane) (Sigma, USA). The assay to determine SOD (EC 1.15.1.1) activity was performed according to Srivastava *et al.* (25) and expressed in U/mg of protein. SOD activity was determined by the capacity of SOD to inhibit the autoxidation of pyrogallol. CAT (EC 1.11.1.6) activity was measured according to the method of Nelson and Kiesov (26)

and expressed by $\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ protein, where ΔE represents the variation in enzyme activity during 1 minute. The total antioxidant capacity (FRAP) was performed according to Benzie and Strain (27), based on the reduction of ferric-tripyridyltriazine [Fe(III)-TPTZ] complex to ferrous-tripyridyltriazine [Fe(II)-TPTZ]. The total antioxidant capacity was expressed as equivalent to Fe^{2+} , estimated by comparison with a standard curve constructed with known concentrations of FeSO_4 and expressed as $\mu\text{g FeSO}_4/\text{mg}$ of protein.

The data were analyzed using the SPSS statistical package, version 17.0 (Inc., USA). First, was utilized Spearman and Pearson correlation to verify the association between all the biomarkers studied (independent variables) and cognitive and motor composite scores (dependent variables). Then, simple regression analysis was performed with those independent variables that had p value <0.20 . Confirmatory analysis of association between selected biomarkers and cognitive and motor composite scores were performed in multiple linear stepwise regression models without adjustment and adjusting for age and gender. The level of statistical significance was $p < 0.05$.

Results

Fifty infants were evaluated (25 in the overweight/obese group and 25 in the normal-weight group). Among the 16 biomarkers evaluated in plasma, serum or erythrocyte lysate, 4 biomarkers were associated with cognitive composite scores: leptin (Spearman $r=-0.29$; $p=0.04$); sTNFR1 (Spearman $r=0.52$; $p=0.0001$); sTNFR2 (Spearman $r=0.26$; $p=0.07$) and IL8 (Spearman $r=0.23$; $p=0.11$). In relation to motor composite scores, 6 biomarkers have presented association: sTNFR1 (Pearson $r=0.39$; $p=0.005$); sTNFR2 (Pearson $r=0.35$; $p=0.01$); RANTES (Pearson $r=-0.22$; $p=0.13$); SOD (Pearson $r=0.31$; $p=0.08$), CAT (Pearson $r=0.39$; $p=0.03$) and FRAP (Pearson $r=0.30$; $p=0.12$). Then, these biomarkers were selected to performed simple linear regression analysis.

The results of Table 1 showed that only the biomarkers leptin, sTNFR1 and sTNFR2 were significantly associated with cognitive composite scores ($p<0.05$) and the biomarkers sTNFR1, sTNFR2 and CAT were significantly associated with motor composite scores ($p<0.05$). Multiple linear stepwise regression models were tested (Table 2).

The multiple linear regression analysis showed a significant association of plasma leptin and sTNFR1 levels with cognitive composite scores, and these two independents variables together explained 37% of the variability of cognitive composite scores ($p=0.001$). However, only plasma sTNFR1 levels were associated and explained 24% of the variability of motor composite scores ($p=0.003$). In this way, plasma sTNFR1 levels were positively

associated given the increasing of 1 pg/mL of sTNFR1 increases 0.56 points in cognitive composite score and 0.51 points in motor composite score (Table 2). The increased leptin plasma levels were associated significantly negatively given the increasing of 1 pg/mL of leptin decreases 0.40 points in cognitive composite scores. After adjusting for age and gender, there were no differences in the β and R^2 values, demonstrating that these factors were not considered confounders factors in our sample.

Discussion

The results of this study showed two obesity-related biomarkers associated with infant development infants between 6 and 24 months of age. Thus, sTNFR1 was directly associated with cognitive and motor development and leptin biomarker was inversely associated with cognitive development. This is the first study evaluating the relationship between obesity-related biomarkers with cognitive and motor development in this age interval.

In this study, the increasing sTNFR1 plasma levels was the main predictor of elevated cognitive and motor scores. Thereby, sTNFR1 levels can lead deleterious or protective effects in neurons contributing to neuronal injury or neuroprotection (9, 10). In general, low levels of pro-inflammatory biomarkers induce growth factors synthesis and cell survival, whereas moderate-to-high levels can impair neurogenesis (28). In the study of Terrado et al. (29) in mice, a significant increase in the level of circulating sTNFR1 was associated with a higher survival rate of motor neurons in the central nervous system. Thus, TNF neutralization by sTNFR1 can decrease cell death of injured motor neurons. In contrast, high levels of pro-inflammatory biomarkers such as sTNFR1 can also trigger neuroinflammation which in turn, impairs neurogenesis and brain development (8).

Then, sTNFR1 levels can trigger brain damage or neuroprotection, reflecting the complexity of TNF actions in the central nervous system (29). A previous study of our research group has shown that sTNFR1 plasma levels did not differ significantly between overweight/obese and normal-weight infants between 6 and 24 months, suggesting the absence of a low-grade inflammation state in overweight/obese infant in this age group. In this way, the increased levels of sTNFR1 seem to enhance cognitive and motor development in infants between 6 and 24 months independently of the weight excess.

Another important finding of this study was related to increased leptin plasma levels associated with a reduced cognitive score. It is known that leptin receptors act on a receptor localized in the hypothalamus (7), and elsewhere in brain, to regulate energy balance and other functions, such as cognition (6). According Udagawa et al. (30), leptin is essential to

complete brain development during fetal and neonatal periods. Thus, leptin is considered an important hormonal signaling in CNS development, growth and maturation (7). Furthermore, leptin acts in the hippocampus playing a crucial role in learning and memory process (6, 31). However, obesity is associated with chronically elevated leptin but also with limited cognitive function (5). Then, leptin levels may contribute to memory impairment since leptin resistance occurs in the brain (31).

In our previous study overweight/obese infants between 6 and 24 months presented higher levels of leptin compared to normal-weight peer, which may predispose to leptin resistance. Moreover, the increased leptin plasma levels can create an environment that predisposes to a subsequent pro-inflammatory response. Thus, the dysregulation of pro-inflammatory adipokines may have a detrimental effect on neurogenesis and point out the importance of neuroinflammation in the microenvironment around neural stem cell development (8). As obesity has its onset during infancy when a rapid brain development is occurring, infants can be exposed to potential effects of obesity-related biology during developmental critical periods. During this period the brain-behavior connections are being established and begin to shape subsequent to long-term developmental outcomes (3). The study of Jiang *et al.* (32) found that biomarkers related to inflammation can predict developmental outcomes, since elevated levels of pro-inflammatory cytokines such as IL1- β e IL-6 were associated with reduced neurodevelopmental scores in the first year of life.

However, other obesity-related biomarkers were not associated or couldn't predict cognitive and motor development in infants. It has been also found higher cortisol, BDNF and adiponectin levels in overweight/obese infants compared with normal-weight peers in our previous study, but these differences were not related to cognitive and motor development in the present study. Other studies have demonstrated that these biomarkers are associated with developmental outcomes early in life. In the study of Forns *et al.* (11), higher cortisol levels were positively associated with cognitive development in infants during the second year of life. In contrast, higher cortisol levels would be predictive of reduced executive functioning and academic achievement in children 36 months of age (12). Additionally, BDNF levels were negatively associated with cognitive development in preschool children, suggesting that BDNF dysregulation may also play a role in the development of intellectual disability (13). Moreover, higher plasma adiponectin levels were associated with degeneration and cognitive impairment in adults (33).

The literature also points that the childhood obesity is associated with dysregulation of pro-inflammatory adipokines and redox imbalance which can potentially affects brain

development and leads to neurodegenerative diseases (3, 8, 28). However, the results of our previous study have demonstrated that in overweight/obese infants the low-grade inflammatory state has not yet been triggered, since there was no significant difference in resistin, sTNFR1, sTNFR2, MCP-1, RANTES, IL-8, IP-10 and MIG plasma levels. Moreover, overweight/obese infants have presented reduced TBARS levels and antioxidants enzymes (CAT and SOD activity), but little is known about a link between redox imbalance and infant development.

It is important to note that some associations may be development or modified over time, since overweight or obese in this age interval may not have been firmly established. Thereby, we aimed to test whether specific obesity-related biomarkers were associated and could predict developmental outcomes in infants. Our findings suggest relevant connections between physiological pathways for obesity and infant development. Physiology, while not deterministic, can play a critical role in developmental outcomes (5). Thus, to our knowledge this is the first report which highlighted that leptin and sTNFR1 plasma levels explain together 37% of the variability of cognitive composite scores and sTNFR1 plasma levels explain 24% of the variability of motor composite scores. However, the infant development is multifactorial and is influenced by both biology and the environmental (34).

In conclusion, high sTNFR1 and reduced leptin levels were associated with increase developmental outcomes in infants between 6 and 24 months of age. Although sTNFR1 levels were the main predictor to increase cognitive and motor scores, this association appears not to be related to excess weight in infants. The increased leptin levels could create an environment which predispose to a subsequent pro-inflammatory response related to obesity and reduces the cognitive scores.

Acknowledgments

We are thankful the Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri for institutional support, the CNPq, FAPEMIG, and CAPES for financial support and scholarships. We thank the Camila Alves de Andrade and Katherine Simone Caires Oliveira for assistance in data collection; Rosalina Tossige Gomes and Camila Danielle Cunha Neves for assistance in conducting experiments; and José Sebastião Cunha Fernandes for statistical assistance.

List of abbreviations:

sTNFR1 - Soluble tumour necrosis factor receptors 1

sTNFR2 - Soluble tumour necrosis factor receptors 2

TBARs - Thiobarbituric acid reactive substances

BDNF - Brain-derived neurotrophic factor

SOD - Superoxide dismutase

CAT - Catalase

MCP-1 - Monocyte chemoattractant protein-1

RANTES - Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted

IL-8 - Interleukin-8

IP-10 - Interferon-inducible protein 10

MIG - Monokine induced by interferon- γ

FRAP - Ferric reducing antioxidant power

BMI - Body mass index

Bayley-III - Bayley Scales of Infant and Toddler Development, 3rd edition

References

1. Blake-Lamb TL, Locks LM, Perkins ME, Baidal JAW, Cheng ER, Taveras EM. Interventions for Childhood Obesity in the First 1,000 Days A Systematic Review. *Am J Prev Med* 2016; 50:780-9.
2. Johnson MH. Functional brain development in humans. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2:475-83.
3. Miller AL, Lee HJ, Lumeng JC. Obesity-associated biomarkers and executive function in children. *Pediatr Res* 2014; 77:143-7.
4. Taanila A, Murray GK, Jokelainen J, Isohanni M, Rantakallio P. Infant developmental milestones: A 31-year follow-up. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47:581-6.
5. Miller AL, Lumeng CN, Delproposto J, Florek B, Wendorf K, Lumeng JC. Obesity-Related Hormones in Low-Income Preschool-Age Children: Implications for School Readiness. *Mind Brain Educ* 2013; 7:246-55.
6. Stieg MR, Sievers C, Farr O, Stalla GK, Mantzoros CS. Leptin: a hormone linking activation of neuroendocrine axes with neuropathology. *Psychoneuroendocrinology* 2015; 51:47-57.
7. Farr OM, Tsoukas MA, Mantzoros CS. Leptin and the brain: influences on brain development, cognitive functioning and psychiatric disorders. *Metabolism* 2015; 64:114-30.

8. Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, Gass P, Riva MA, Molteni R. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. *Front Cell Neurosci* 2014; 8:430.
9. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147: S232-40.
10. García-Bueno B, Caso JR, Leza JC. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32:1136-51.
11. Forns J, Vegas O, Julvez J, Garcia-Esteban R, Rivera M, Lertxundi N, et al. Association between Child Cortisol Levels in Saliva and Neuropsychological Development during the Second Year of Life. *Stress Health* 2014; 30:142-8.
12. Berry D, Blair C, Willoughby M, Granger DA, Family Life Project Key Investigators. Salivary alpha-amylase and cortisol in infancy and toddlerhood: Direct and indirect relations with executive functioning and academic ability in childhood. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37:1700-11.
13. Yeom CW, Park YJ, Choi SW, Bhang SY. Association of peripheral BDNF level with cognition, attention and behavior in preschool children. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health* 2016; 10:10.
14. Yoshinaga M, Sameshima K, Tanaka Y, Wada A, Hashiguchi J, Tahara H, et al. Adipokines and the prediction of the accumulation of cardiovascular risk factors or the presence of metabolic syndrome in elementary school children. *Circ J* 2008; 72:1874-8.
15. Oliver SR, Rosa JS, Milne GL, Pontello AM, Borntrager HL, Heydari S, et al. Increased oxidative stress and altered substrate metabolism in obese children. *Int J Pediatr Obes* 2010; 5:436-44.
16. Veldhorst MA, Noppe G, Jongejan MH, Kok CB, Mekic S, Koper JW, et al. Increased scalp hair cortisol concentrations in obese children. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 99:285-90.
17. Araki S, Yamamoto Y, Dobashi K, Asayama K, Kusuhara K. Decreased plasma levels of brain-derived neurotrophic factor and its relationship with obesity and birth weight in obese Japanese children. *Obes Res Clin Pract* 2014; 8:e63-9.
18. Datar A, Sturm R. Childhood overweight and elementary school outcomes. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30:1449-60.
19. Castetbon K, Andreyeva T. Obesity and motor skills among 4 to 6-year-old children in the United States: Nationally-representative surveys. *BMC Pediatr* 2012; 12:28.
20. Onis M. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl* 2006; 95:76-85.

21. Bayley N. Bayley scales of infant and toddler development: Administration manual: Harcourt Assessment; 2006.
22. Glass GA, Gershon D. Enzymatic changes in rat erythrocytes with increasing cell and donor age: loss of superoxide dismutase activity associated with increases in catalytically defective forms. *Biochem Biophys Res Commun* 1981; 103:1245-53.
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
24. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-8.
25. Srivastava S, Chandrasekar B, Gu Y, Luo J, Hamid T, Hill BG, et al. Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to β -adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. *Cardiovasc Res* 2007; 74:445-55.
26. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972; 49:474-8.
27. Benzie IF, Strain J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239:70-6.
28. Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2009; 108:1343-59.
29. Terrado J, Monnier D, Perrelet D, Vesin D, Jemelin S, Buurman WA, et al. Soluble TNF receptors partially protect injured motoneurons in the postnatal CNS. *Eur J Neurosci* 2000; 12:3443-7.
30. Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R, Otani H. Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. *Congenit Anom (Kyoto)* 2007; 47:77-83.
31. Farr SA, Banks WA, Morley JE. Effects of leptin on memory processing. *Peptides* 2006; 27:1420-5.
32. Jiang NM, Tofail F, Moonah SN, Scharf RJ, Taniuchi M, Ma JZ, et al. Febrile illness and pro-inflammatory cytokines are associated with lower neurodevelopmental scores in Bangladeshi infants living in poverty. *BMC pediatr* 2014; 14:50.
33. Wennberg A, Gustafson D, Hagen CE, Roberts RO, Knopman D, Jack Jr C, et al. Serum Adiponectin Levels, Neuroimaging, and Cognition in the Mayo Clinic Study of Aging. *J Alzheimers Dis* 2016; 53:573-81.

34. Neelon SEB, Oken E, Taveras EM, Rifas-Shiman SL, Gillman MW. Age of achievement of gross motor milestones in infancy and adiposity at age 3 years. *Matern Child Health J* 2012; 16:1015-20.

Table 1. Simple linear regression analysis with cognitive and motor composite scores.

Biomarkers	Cognitive composite scores		Motor composite scores	
	β	p	β	P
Leptin	-0.30	0.04*	-	-
sTNFR1	0.49	0.0001*	0.41	0.003*
sTNFR2	0.35	0.01*	0.38	0.006*
IL8	0.18	0.21	-	-
RANTES	-	-	-0.17	0.25
SOD	-	-	0.31	0.08
CAT	-	-	0.39	0.03*
FRAP	-	-	0.30	0.11

Legend: β , standardized regression coefficient; sTNFR1, soluble TNF receptor 1; sTNFR2, soluble TNF receptor 2, IL8, interleukin 8; RANTES, regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted; SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase, FRAP, ferric reducing antioxidant power.

Table 2. Multiple linear regression analysis.

Biomarkers	Cognitive composite scores			Motor composite scores		
	β	p	R^2	β	p	R^2
			0.37			0.24
Leptin	-0.40	0.001*				
sTNFR1	0.56	0.0001*		0.51	0.003*	
sTNFR2	-0.14	0.40		0.11	0.66	
CAT				0.22	0.16	

Legend: β , standardized regression coefficient; R^2 , adjusted determination coefficient; sTNFR1, soluble TNF receptor 1; sTNFR2, soluble TNF receptor 2; CAT, catalase.